

Friedrich-Schiller-Universität Jena
Biologisch-Pharmazeutische Fakultät



**Funktion von Gpm1p
bei der Komplementevasion, Dissemination und Virulenz
der humanpathogenen Hefe *Candida albicans***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Dipl.-Biologin Sophia Poltermann
geboren am 19.04.1980 in Erfurt

Jena, Juli 2008

Gutachter

1. Prof. Dr. Peter F. Zipfel
Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e.V./
Hans-Knöll-Institut Jena
Abt. Infektionsbiologie
Beutenbergstraße 11a
07745 Jena
2. Prof. Dr. Bernhard Hube
Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e.V./
Hans-Knöll-Institut Jena
Abt. Mikrobielle Pathogenitätsmechanismen
Beutenbergstraße 11a
07745 Jena
3. PD Dr. Steffen Rupp
Fraunhofer IGB
Nobelstraße 12
70569 Stuttgart

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| INHALTSVERZEICHNIS | I |
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | IV |
| ABBILDUNGSVERZEICHNIS..... | V |
| TABELLENVERZEICHNIS | VI |
| ZUSAMMENFASSUNG | 1 |
| SUMMARY | 3 |
| 1. EINLEITUNG..... | 5 |
| 1.1. Die humanpathogene Hefe <i>Candida albicans</i> | 5 |
| 1.2. Das Komplementsystem | 7 |
| 1.2.1. Aktivierung des Komplementsystems | 8 |
| 1.2.2. Regulation des Komplementsystems | 10 |
| 1.2.2.1. Regulation des AP durch Proteine der Faktor H-Familie | 10 |
| 1.2.3. Komplementevasion | 13 |
| 1.2.4. Bedeutung des Komplementsystems für <i>C. albicans</i> | 16 |
| 1.3. Das Fibrinolysesystem / Plasmin(ogen)system..... | 17 |
| 1.3.1. Aktivierung und Regulation von Plasmin(ogen)..... | 18 |
| 1.3.2. Plasmin(ogen)rezeptoren..... | 19 |
| 1.4. Ziele der Arbeit | 20 |
| 2. MATERIAL UND METHODEN..... | 22 |
| 2.1. Mikrobiologische Arbeiten | 22 |
| 2.1.1. Verwendete Stämme | 22 |
| 2.1.2. Kultivierung und Konservierung der Stämme | 22 |
| 2.1.3. Bestimmung der Wachstumsraten von <i>C. albicans</i> | 23 |

| | |
|--|-----------|
| 2.2. Molekularbiologische Arbeiten..... | 24 |
| 2.2.1. Polymerasekettenreaktion (PCR) | 24 |
| 2.2.2. Isolierung von DNA aus Agarosegelen..... | 26 |
| 2.2.3. Restriktion und Ligation von DNA..... | 26 |
| 2.2.4. Transformation von <i>E. coli</i> | 26 |
| 2.2.5. Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i> | 27 |
| 2.2.6. DNA-Sequenzierung | 27 |
| 2.2.7. Transformation von <i>P. pastoris</i> | 27 |
| 2.2.8. Transformation von <i>C. albicans</i> | 28 |
| 2.2.9. Klonierungsstrategie von <i>CaGPM1</i> | 28 |
| 2.2.10. Disruption und Reintegration des <i>CaGPM1</i> -Gens..... | 28 |
| 2.3. Proteinbiochemische und immunologische Arbeiten..... | 30 |
| 2.3.1. Expression rekombinanter Proteine..... | 30 |
| 2.3.2. Chromatographie | 31 |
| 2.3.3. SDS-PAGE..... | 31 |
| 2.3.4. Silberfärbung..... | 32 |
| 2.3.5. Western-Blot | 32 |
| 2.3.6. Proteinbindungsstudien | 33 |
| 2.3.6.1. ProtoArray..... | 33 |
| 2.3.6.2. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)..... | 34 |
| 2.3.7. Immunfluoreszenz und Durchflußzytometrie | 35 |
| 2.3.8. Herstellung der Zytoplasma- und Zellwand-Fraktion von <i>C. albicans</i> | 36 |
| 2.4. Funktionale Studien | 36 |
| 2.4.1. Kofaktor Assay | 36 |
| 2.4.2. Aktivierung von Plasminogen und Bestimmung der Plasmin-Aktivität | 37 |
| 2.4.3. <i>Candida</i> -ELISA | 37 |
| 2.4.4. Virulenztest | 38 |
| 2.5. Verwendete Software | 38 |
| 3. ERGEBNISSE | 40 |
| 3.1. Identifizierung von ScGpm1p als ein Faktor H- und FHL-1- bindendes Protein | 40 |
| 3.2. Klonierung, rekombinante Expression und Aufreinigung von Gpm1p aus <i>C. albicans</i> | 41 |
| 3.3. Bindung der humanen Plasmaproteine Faktor H, FHL-1 und Plasminogen an CaGpm1p | 43 |
| 3.3.1. Lokalisierung der Binderegionen in Faktor H und FHL-1 | 44 |
| 3.3.2. Komplement-regulatorische Aktivität von CaGpm1p-gebundenem Faktor H und FHL-1 | 45 |

| | |
|--|-----------|
| 3.3.3. Lysin-abhängige Bindung von Plasminogen an CaGpm1p | 47 |
| 3.3.4. Aktivierung von CaGpm1p-gebundenem Plasminogen zu Plasmin | 47 |
| 3.4. Gpm1p ist ein Oberflächenprotein von <i>C. albicans</i>..... | 49 |
| 3.5. In vivo-Analyse der Funktionen von CaGpm1p | 51 |
| 3.5.1. Herstellung einer <i>C. albicans gpm1</i> -Nullmutante | 51 |
| 3.5.2. Wachstum der <i>Cagpm1</i> -Nullmutante CAP3 auf alternativen Kohlenstoffquellen..... | 52 |
| 3.5.3. Bindung von Faktor H und Plasminogen aus humanem Serum an die <i>Cagpm1</i> - Nullmutante CAP3 | 55 |
| 3.5.4. Avirulenz der <i>Cagpm1</i> -Nullmutante CAP3 im embryonierten Hühnerei-Modell..... | 56 |
| 4. DISKUSSION | 58 |
| 4.1. Gpm1p - ein neues Oberflächenprotein von <i>C. albicans</i> | 59 |
| 4.2. CaGpm1p - ein multifunktionelles Protein | 61 |
| 4.2.1. Funktion des extrazellulären CaGpm1p | 62 |
| 4.2.2. Funktion des intrazellulären CaGpm1p | 65 |
| 4.3. Gpm1p - ein Virulenzfaktor von <i>C. albicans</i> | 66 |
| 4.4. Ausblick | 68 |
| 5. SCHLUSSFOLGERUNG | 69 |
| 6. LITERATUR | 70 |
| EIGENE WISSENSCHAFTLICHE BEITRÄGE | 82 |
| DANKSAGUNG | 84 |
| THESEN | 85 |
| SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG | 87 |
| LEBENS LAUF | 88 |

Abkürzungsverzeichnis

Die physikalischen und chemischen Einheiten sind entsprechend des SI-Standards angegeben. Für Aminosäuren wird der Drei-Buchstaben-Code benutzt. Es werden Standardabkürzungen für Chemikalien und Verbindungen verwendet.

| | |
|---------------------|--|
| A _{490 nm} | Absorbtion bei 490 nm |
| Abb. | Abbildung |
| AK | Antikörper |
| AP | “alternative pathway” (alternativer Weg der Komplementaktivierung) |
| bp | “base pairs” (Basenpaare) |
| BSA | “bovine serum albumin” (Rinderserumalbumin) |
| CP | “classical pathway” (klassischer Weg der Komplementaktivierung) |
| CR | “complement receptor” |
| CRASP | “complement regulator-acquiring surface protein” |
| DIC | “differential interference contrast” |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| εACA | ε-Aminocapronsäure |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ELISA | “enzyme-linked immunosorbent assay” |
| FHL-1 | “factor H like protein” |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| FPLC | “fast protein liquid chromatography” |
| HRP | “horseradish peroxidase” (Meerrettichperoxidase) |
| iC3b | inaktiviertes C3b |
| Ig | Immunglobulin |
| kb | Kilobasen |
| kDa | Kilodalton |
| LB | Luria Bertani-Medium |
| LP | “lectin pathway” (Lektin-Weg der Komplementaktivierung) |
| LSM | “laser scanning microscopy” |
| NHS | normales humanes Serum |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBS | “phosphate buffered saline” |
| PCR | “polymerase chain reaction” (Polymerasekettenreaktion) |
| rpm | “rounds per minute” (Umdrehungen pro Minute) |
| RT | Raumtemperatur |
| Sab | Sabouraud-Medium |
| SCR | “short consensus repeat” |
| SDS | “sodium dodecyl sulphate” (Natriumdodecylsulfat) |
| Tab. | Tabelle |
| TBE | Tris-Borat-EDTA |
| u-PA | “urokinase-type plasminogen activator” (Urokinase) |
| v/v | “volume/volume” (Volumen/Volumen) |
| w/v | “weight/volume” (Gewicht/Volumen) |
| YP | yeast peptone |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abb. 1: Aktivierung, Regulation und Funktion des Komplementsystems, modifiziert nach (Zipfel, 2002). | 9 |
| Abb. 2: Struktur und funktionelle Proteindomänen von Faktor H und FHL-1. | 12 |
| Abb. 3: Struktur von Plasmin(ogen) (Lähteenmäki <i>et al.</i> , 2001). | 18 |
| Abb. 4: Strategie der Disruption und Reintegration des <i>GPM1</i> -Gens in <i>C. albicans</i> | 29 |
| Abb. 5: Identifizierung von ScGpm1p als ein Faktor H- und FHL-1-bindendes Protein. | 40 |
| Abb. 6: Restriktion des pPICZ α B- <i>CaGPM1</i> -Konstrukts. | 42 |
| Abb. 7: Rekombinante Expression von CaGpm1p. | 42 |
| Abb. 8: Bindung von humanen Plasmaproteinen an rekombinantes CaGpm1p. | 43 |
| Abb. 9: Lokalisierung der Binderegionen in Faktor H und FHL-1. | 44 |
| Abb. 10: Kofaktoraktivität von Faktor H und FHL-1 nach Bindung an CaGpm1p. | 46 |
| Abb. 11: Lysin-Reste vermitteln die Interaktion von CaGpm1p und Plasminogen. | 47 |
| Abb. 12: CaGpm1p-gebundenes Plasminogen wird zu aktivem Plasmin umgewandelt. | 48 |
| Abb. 13: Charakterisierung des generierten CaGpm1p-Antiserums. | 49 |
| Abb. 14: Oberflächenlokalisierung von CaGpm1p. | 50 |
| Abb. 15: Verifizierung der <i>CaGPM1</i> -Mutantenstämme durch Western-Blot mit CaGpm1p-Antiserum. | 52 |
| Abb. 16: Hemmung des Wachstums der <i>Cagpm1</i> -Nullmutante CAP3 auf Glycerol-Medium in Anwesenheit von Glukose. | 54 |
| Abb. 17: Wachstumsanalyse der <i>C. albicans</i> -Stämme in Flüssigmedien. | 55 |
| Abb. 18: Bindung von Faktor H und Plasminogen an die <i>C. albicans</i> -Stämme. | 56 |
| Abb. 19: CaGpm1p ist für die vollständige Virulenz von <i>C. albicans</i> erforderlich. | 57 |
| Abb. 20: Rolle von Gpm1p beim Kohlenstoffwechsel. | 60 |
| Abb. 21: CaGpm1p ist ein multifunktionelles Protein. | 64 |
| Abb. 22: Kladogramm von Gpm1p, modifiziert nach (Heinisch <i>et al.</i> , 1998). | 66 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tab. 1: Mikrobielle Komplementregulatoren-bindende Proteine (Auswahl). | 15 |
| Tab. 2: Mikrobielle Plasmin(ogen)-bindende Proteine (Auswahl). | 20 |
| Tab. 3: Verwendete und im Rahmen dieser Arbeit konstruierte <i>C. albicans</i> -Stämme. | 22 |
| Tab. 4: Verwendete Oligonukleotide (Primer) für die Klonierung, Sequenzierung und Mutagenese von CaGpm1p. | 25 |
| Tab. 5: Verwendete PCR-Programme. | 25 |
| Tab. 6: Verwendete Antikörper für Western-Blot, ELISA, Durchflußzytometrie, Immunfluoreszenz. | 34 |
| Tab. 7: Mittels „ProtoArray“ identifizierte Interaktionen von Faktor H und FHL-1 mit <i>S. cerevisiae</i> -Proteinen. | 41 |
| Tab. 8: Wachstumsphänotypen der <i>CaGPM1</i> -Mutantenstämme auf Festmedien. | 53 |

Zusammenfassung

Der Mensch besitzt zahlreiche Mechanismen, eingedrungene körperfremde Mikroben zu erkennen und abzutöten sowie die körpereigene Integrität zu schützen. Pathogene Erreger haben es gelernt, die humanen Schutzsysteme zum eigenen Vorteil zu nutzen, um so ihr Überleben im Wirt zu sichern. Das Komplementsystem ist ein wesentlicher Bestandteil der angeborenen Immunität und ist in der Lage, Mikroben zu erkennen und zu eliminieren. Die bedeutendste humanpathogene Hefe *Candida albicans* wird vom humanen Komplementsystem erkannt, entgeht aber der Komplementattacke durch die Bindung der wichtigsten humanen Komplementregulatoren des alternativen Weges Faktor H und FHL-1, die normalerweise körpereigene Zellen und Oberflächen schützen. Darüber hinaus benutzt *C. albicans* das humane fibrinolytische System zur Gewebsinvasion. Bis jetzt ist die molekulare Grundlage dieser Interaktionen zwischen dem Menschen und *C. albicans* weitgehend unverstanden.

In der vorliegenden Arbeit wurde das erste fungale Protein identifiziert, das die Wirtsimmunregulatoren Faktor H und FHL-1 bindet. Durch das Screening eines Proteinarrays von *Saccharomyces cerevisiae* wurde die Phosphoglycerat-Mutase (ScGpm1p) als ein Faktor H- und FHL-1-bindendes Protein identifiziert. Das homologe *C. albicans* Gpm1p (CaGpm1p) wurde kloniert und rekombinant exprimiert. Das aufgereinigte CaGpm1p band *in vitro* spezifisch Faktor H und FHL-1, aber nicht C4BP. Die Binderegionen für CaGpm1p wurden innerhalb der beiden Wirtsproteine identifiziert. FHL-1 band an CaGpm1p durch die SCRs 6 und 7, und Faktor H verwendete für den Kontakt zwei Binderegionen, die in den SCRs 6 und 7 sowie in den SCRs 19 und 20 lokalisiert sind. Darüber hinaus interagierte *in vitro* humanes Plasminogen mittels Lysin-Resten mit rekombinantem CaGpm1p. Jedes der drei humanen Plasmaproteine war in CaGpm1p-gebundener Form funktionell aktiv. Faktor H und FHL-1 agierten als Kofaktor für die Faktor I-vermittelte Spaltung von C3b und gebundenes Plasminogen wurde durch den Urokinase-Plasminogenaktivator zu fibrinolytisch aktivem Plasmin umgewandelt. CaGpm1p ist ein Oberflächenprotein, das in der Zellwand-Fraktion durch Western-Blot und durch Immunfärbung von intakten *C. albicans*-Hefezellen und -Hyphen mit einem

spezifischen Antiserum nachgewiesen wurde. Folglich akquiriert das Oberflächenprotein CaGpm1p im Plasma bzw. Gewebe die humanen Komplementregulatoren Faktor und FHL-1 sowie den Wirtsproteasen-Vorläufer Plasminogen an die *C. albicans*-Oberfläche. Dieser Erwerb und die Bedeckung der *C. albicans*-Oberfläche führt zu Immunevasion und Degradation von extrazellulärer Matrix bzw. Gewebsinvasion. Die *in vivo*-Funktion von CaGpm1p wurde durch die in dieser Arbeit erzeugte *Cagpm1*-Nullmutante CAP3 (*gpm1/gpm1*) überprüft. Die Bindung von Faktor H und Plasminogen an CAP3 war nur geringfügig reduziert, was auf die Existenz von redundanten Bindeproteinen hinweist. Darüber hinaus zeigte CAP3 einen Wachstumsdefekt auf glykolytischen und gluconeogenischen Substraten und war avirulent im embryonierten Hühnerei-Modell. Folglich besitzt CaGpm1p intrazellulär enzymatische Funktionen in der Glykolyse und Gluconeogenese. Dies ermöglicht die flexible metabolische Anpassung von *C. albicans* an verschiedene Wirtsnischen und trägt somit zur Virulenz bei.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, wie *C. albicans* auf molekularer Ebene mit dem Menschen interagiert und dass das multifunktionelle CaGpm1p für verschiedene Phasen der Pathogenese von *C. albicans* genutzt wird.

Summary

Humans employ numerous mechanisms for recognition and elimination of invading microbes as well as for protection of self structures. Pathogens utilize these host defence mechanisms to protect themselves and to survive in the human host. The human complement system is an important part of the innate immunity and essential to fight invading microbes. The human pathogenic yeast *Candida albicans* utilizes host complement regulators (Factor H and FHL-1) for immune evasion. Furthermore *C. albicans* applies the host fibrinolytic system for tissue invasion. So far the molecular basis of these interactions between the human host and *C. albicans* is not well understood.

In this thesis the first fungal protein that binds Factor H and FHL-1 was identified. By screening a protein array of 4088 proteins of *Saccharomyces cerevisiae*, phosphoglycerate mutase (ScGpm1p) was identified as a Factor H- and FHL-1-binding protein. The homologous *C. albicans* Gpm1p (CaGpm1p) was cloned and recombinantly expressed as a 36 kDa His-tagged protein. Purified CaGpm1p binds the host complement regulators Factor H and FHL-1, but not C4BP. The CaGpm1p binding regions in the host proteins were localized; FHL-1 binds via short consensus repeats (SCRs) 6 and 7, and Factor H utilizes two contact regions that are located in SCRs 6 and 7 and in SCRs 19 and 20. In addition, recombinant CaGpm1p binds plasminogen via lysine residues. Attached to CaGpm1p, each of the three host plasma proteins is functionally active. Factor H and FHL-1 show cofactor activity for cleavage of C3b, and bound plasminogen is converted by urokinase-type plasminogen activator to proteolytically active plasmin. CaGpm1p is a surface protein as demonstrated by immunostaining and flow cytometry. Thus, the surface-expressed CaGpm1p utilizes the host Factor H, FHL-1, and plasminogen for immune evasion and degradation of extracellular matrices. A *C. albicans* *gpm1* knockout strain (*gpm1/gpm1*, CAP3) was generated and tested for binding of Factor H and plasminogen. Reduced binding of Factor H and plasminogen to the *Cagpm1* knockout strain CAP3 is in agreement with the presence of additional binding proteins. Furthermore CAP3 shows growth defects on glycolytic and gluconeogenic substrates indicating enzymatic functions of CaGpm1p in glycolysis and

gluconeogenesis. In addition CAP3 was avirulent in the hen's egg infection model. Thus, the enzymatic function of CaGpm1p is required for metabolic flexibility and virulence of *C. albicans*.

In conclusion, this thesis contributes to shed light on the molecular interactions between *C. albicans* and humans and identifies how the multifunctional CaGpm1p contributes to pathogenesis of *C. albicans*.

1. Einleitung

Täglich ist der Mensch mit einer Vielzahl von Mikroben konfrontiert. Das Immunsystem dient jedoch dem Menschen als Schutz gegen körperfremde Erreger wie Bakterien, Pilze und Viren. Pathogene sind solche Organismen, die den zahlreichen Angriffen des humanen Immunsystems entgehen können und so im Wirt überleben. Das humane Komplementsystem stellt eine erste, sehr wirkungsvolle Verteidigungslinie gegen eingedrungene Erreger dar. Viele Pathogene haben jedoch Evasionsstrategien entwickelt, die ihnen das Überleben der Komplementattacke ermöglichen. Darüber hinaus besitzen auch einige Mechanismen des Koagulationssystems eine Funktion bei der Infektabwehr. Nach der primären Kolonisierung des Wirts kann die Infektion durch invasive Ausbreitung der Pathogene unter Verwendung des humanen fibrinolytischen Systems fortschreiten. Anschließend ist die flexible Adaptation der Pathogene an wechselnde Wachstumsbedingungen in den verschiedenen Wirtsnischen essentiell. Die Etablierung einer Infektion ist somit ein komplexer Prozess an dem zahlreiche Interaktionen zwischen humanen Komponenten und Pathogenstrukturen beteiligt sind. Die Aufklärung dieser Mechanismen auf molekularer Ebene ist entscheidend für die erfolgreiche Behandlung von Infektionskrankheiten und die Entwicklung neuer Therapien.

1.1. Die humanpathogene Hefe *Candida albicans*

Candida albicans ist die wichtigste humanpathogene Hefe und gehört dem Verwandtschaftskreis der Ascomyceten an. Die Hefe ist der Erreger der Kandidosis. *C. albicans*-Infektionen haben in den letzten Jahrzehnten an Anzahl, Schwere und Bedeutung zugenommen (Pfaller & Diekema, 2007). Die Ursachen dieser opportunistischen Infektion sind vorwiegend Antibiotika-, Immun- oder Tumorthérapien, invasive medizinische Eingriffe sowie Virusinfektionen, in deren Folge es zu einer Schwächung der humanen Immunabwehr und zur Veränderung der humanen anatomischen Barrieren kommt (Spellberg, 2008). In gesunden

Menschen stellt die Hefe *C. albicans* einen gewöhnlichen Kommensalen dar und besiedelt hauptsächlich die Haut sowie Schleimhäute in der Mundhöhle und im Gastrointestinaltrakt; die Etablierung einer Krankheit wird durch das menschliche Immunsystem und intakte anatomische Barrieren verhindert (Koh *et al.*, 2008). Oberflächliche Infektionen können schnell und erfolgreich durch antifungale Substanzen kontrolliert werden. Hingegen kann *C. albicans* vorwiegend in immunsupprimierten oder granulozytopenischen Patienten in die pathogene Form wechseln und tiefe, systemische Infektionen hervorrufen (Dimopoulos *et al.*, 2007). Systemische *C. albicans*-Infektionen, die schwer zu diagnostizieren und zu behandeln sind, können letal sein (Tortorano *et al.*, 2006). Solche Infektionen entstehen entweder durch induzierte Endozytose (Phan *et al.*, 2007), durch die aktive Penetration des Erregers durch Epithel-Oberflächen der Mundhöhle und der Vagina oder durch intravaskuläre Katheter (Calderone & Fonzi, 2001). In Abwesenheit einer effektiven Immunabwehr disseminiert *C. albicans* über den Blutstrom und kann innere Organe wie die Niere, Leber u. a. kolonisieren. Dies ist die schwerwiegendste Erscheinungsform und stellt die vierthäufigste nosokomiale Infektion mit einer Mortalitätsrate von 40 % dar (Wisplinghoff *et al.*, 2004).

Die Virulenz von *C. albicans* basiert zum einen auf der Fähigkeit an Wirtszellen (Epi- und Endothelzellen) zu binden, was durch Adhäsine wie Als-Proteine und Hwp1p vermittelt wird (Hoyer, 2001, Sundstrom, 2002). Zum anderen fördern verschiedene sekretierte Hydrolasen (SAPs, LIPs, PLBs) die Gewebsinvasion von *C. albicans* und dienen der Bereitstellung von Nährstoffen (Hube *et al.*, 2001, Schaller *et al.*, 2005, Hube, 1996). *C. albicans* nutzt aber auch humane Proteasen zur Penetration des Gewebes (Jong *et al.*, 2003). Des Weiteren korreliert der morphogenetische Wechsel von der Hefe- zur Hyphen-Form mit dem Infektionsprozess und verursacht Adhärenz an Wirtszellen sowie Gewebspenetration (Rooney & Klein, 2002). In Abhängigkeit von den äußeren Wachstumsbedingungen können knospende runde Hefezellen durch kontinuierliche apikale Ausbreitung mit anschließender Septierung echte Hyphen bilden. Oder es entstehen Pseudohyphen durch unipolares Knospen von länglichen Hefezellen ohne anschließende Trennung. An den Pseudohyphen können sich Chlamydosporen (dickwandige kugelförmige Zellen) als terminale Zellen bilden (Ernst, 2000).

Neben den klassischen Virulenzfaktoren ist auch die physiologische Fitness bei der Anpassung an neue Wirtsnischen (Metabolismus und Stress) für die Pathogenität von *C. albicans* von Bedeutung (Brown *et al.*, 2007). Das „Phenotypic Switching“ von *C. albicans* trägt vermutlich auch zur Virulenz bei, da das Pathogen durch stetige Änderungen der Antigenexpression dem Immunsystem entgeht (Soll, 1992). Darüber hinaus bindet *C. albicans* humane Komplementregulatoren, um die Komplementaktivierung auf seiner Oberfläche zu reduzieren (Meri *et al.*, 2002a). Das angeborene Immunsystem stellt die erste Verteidigungslinie gegen *C. albicans* dar (Kapitel 1.2.). *C. albicans* wird sofort mit dem Komplementsystem und phagozytischen Zellen konfrontiert. Die Hefe *C. albicans* hat aber sehr effektive Immunevasionsstrategien entwickelt, um im Wirt zu überleben (Romani, 2004) (Kapitel 1.2.3.) Generell ist aber die Biologie von *C. albicans* wenig verstanden. Dies ist vor allem durch die obligate Diploidie des Pilzes und den nicht vollständigen sexuellen Zyklus bedingt, da diese Faktoren das experimentelle Arbeiten erschweren (Berman & Sudbery, 2002).

1.2. Das Komplementsystem

Die Untersuchungen zu Pilzen und Komplement begannen bereits um 1900, als nach der Inkubation von Hefen in Serum eine Inaktivierung der hitzesensitiven Serumkomponenten, die sonst Bakterien und andere Zellen zerstören, entdeckt wurde (von Dungern, 1900). Diese Beobachtung wurde 1902 durch Ehrlich und Sachs bestätigt (Ehrlich, 1902). Das Komplementsystem repräsentiert einen zentralen Teil der angeborenen Immunität des Wirts und erfüllt zahlreiche Funktionen wie die Erkennung von körperfremden Strukturen, die Kommunikation mit Zellen der adaptiven Immunität und deren Aktivierung sowie die Beseitigung von abgestorbenen oder veränderten Zellen (Walport, 2001, Lambris *et al.*, 2008). Komplement ist nicht nur für die Eliminierung von eingedrungenen Mikroorganismen und die Regulation des adaptiven Immunsystems von Bedeutung, sondern kommuniziert auch mit anderen Kaskaden und Netzwerken im Menschen wie z. B. dem Koagulationssystem (Markiewski *et al.*, 2007). Darüber hinaus gibt es Hinweise auf eine Interaktion zwischen Komplement und Toll-ähnlichen Rezeptoren („toll-like receptors“, TLRs), die die Zytokinantwort moduliert (Hawlich & Kohl, 2006, Zhang *et*

al., 2007). Das Komplementsystem besteht aus einer Gruppe von ca. 40 zirkulierenden und an die Zelloberfläche gebundenen Proteinen, die kaskadenartig aktiviert werden.

1.2.1. Aktivierung des Komplementsystems

Die Komplementkaskade kann durch unterschiedliche Mechanismen aktiviert werden, die sich vor allem in den initialen Schritten unterscheiden. Der klassische Weg („classical pathway“ = CP) wird durch die Erkennung von Antigen-Antikörper-Komplexe durch hexameres C1q initiiert, wohingegen der Lektin-Weg („lectin pathway“ = LP) durch die Bindung von Mannose-bindendem Lektin (MBL) und Fikolinen an Kohlenhydrate auf der Mikrobenoberfläche aktiviert wird. Im Gegensatz dazu wird der alternative Weg („alternative pathway“ = AP) durch die spontane Hydrolyse der Thioesterbindung in C3 und durch das Vorhandensein von fremden Oberflächenstrukturen initiiert (Walport, 2001). Die Rolle des kürzlich beschriebenen Thrombin-Wegs (Huber-Lang *et al.*, 2006) für die Immunabwehr muss noch untersucht werden. Alle Komplementkaskaden konvergieren in der Spaltung von C3 durch die C3-Konvertase und der Bildung seiner aktiven Spaltprodukte C3a und C3b (Abb. 1). Die Opsonisierung von fremden Oberflächen durch C3b erfüllt drei verschiedene Funktionen: die Beseitigung der Zellen durch Phagozytose, die Verstärkung der Komplementaktivierung durch die Bildung einer an die Oberfläche gebundenen C3-Konvertase und den Aufbau der C5-Konvertase (Lambris *et al.*, 2008). Die Spaltung von C5 in C5a und C5b führt zur Bildung des Membranangriffkomplexes („membrane attack complex“ = MAC) und in Folge dessen zur Lyse der Zielzelle. Die hydroxylreiche Oberfläche von Pathogenen fördert die kovalente Bindung von C3b und die Stabilisierung der C3-Konvertase durch den Komplementregulator Properdin. Anschließend vermittelt eine Reihe von Komplementrezeptoren die Erkennung der opsonisierten Zellen durch Leukozyten und das führt zur Phagozytose der Zellen und der Stimulation des adaptiven Immunsystems. Durch die während der Komplementaktivierung frei gesetzten Anaphylatoxine C3a und C5a wird nach Bindung an die Rezeptoren C3aR bzw. C5aR eine Reihe von chemotaktischen und entzündungsfördernden Reaktionen ausgelöst (Walport, 2001).

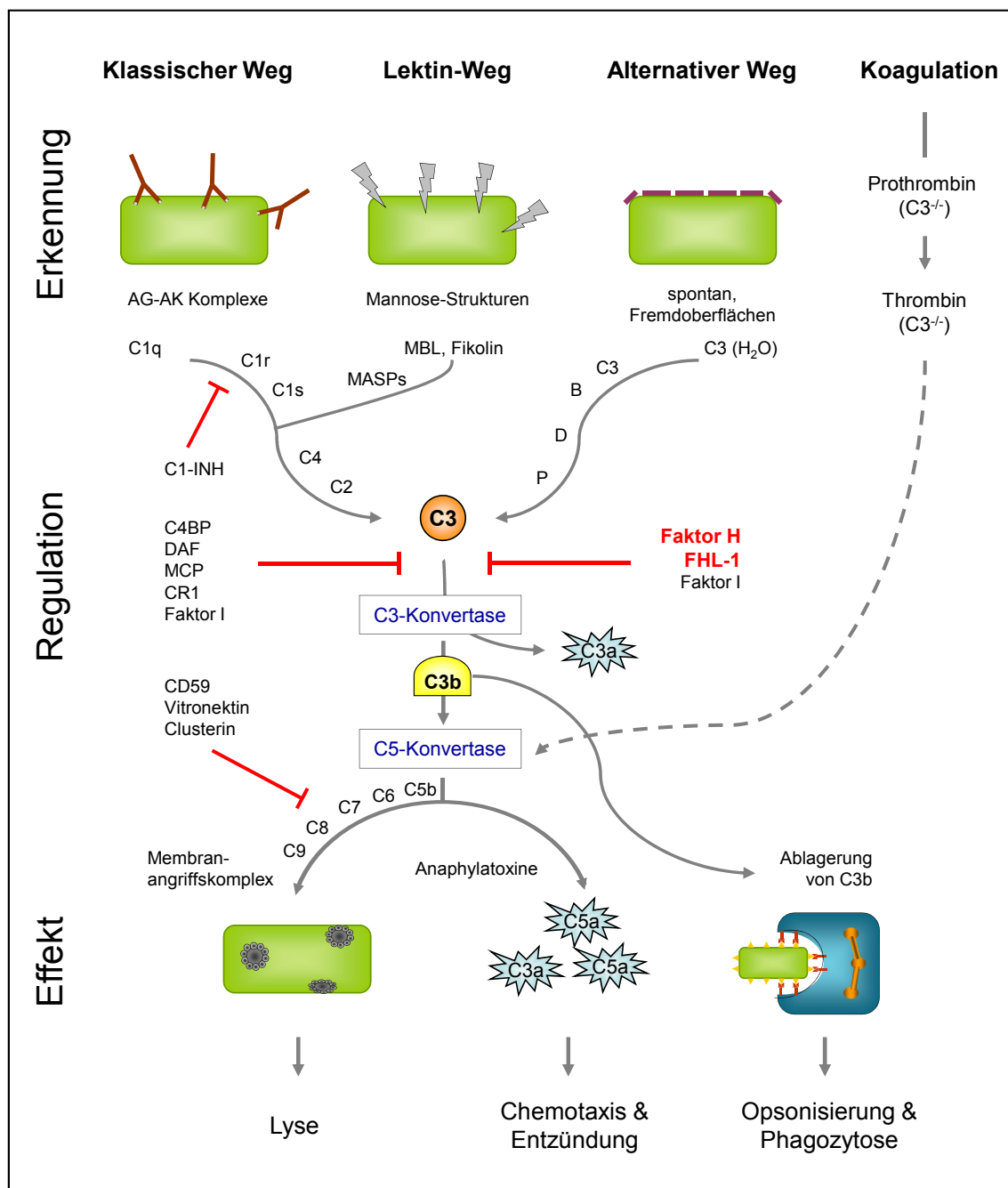


Abb. 1: Aktivierung, Regulation und Funktion des Komplementsystems, modifiziert nach (Zipfel, 2002).

Die vier Aktivierungswege unterscheiden sich in ihrer Initiation und konvergieren auf der Ebene der C3-Aktivierung zu C3b. Die Komplementkaskade führt durch die Bildung von Anaphylatoxinen zu Chemotaxis und Entzündung sowie zur Erkennung und Eliminierung der Mikroben (grün markiert) durch Lyse oder Phagozytose. Membranständige und lösliche Regulatoren kontrollieren die Komplementaktivierung, ihre Angriffsstellen sind durch die roten Blockbalken gekennzeichnet.

1.2.2. Regulation des Komplementsystems

Die Aktivierung der Komplementkaskade muss reguliert werden, damit es nicht zur Schädigung von körpereigenen Zellen kommt. Wurde das Komplementsystem im Verlauf einer Infektion aktiviert, so muss verhindert werden, dass körpereigene Zellen durch reaktive Spaltprodukte geschädigt werden.

So sichern zum einen im Blut zirkulierende lösliche Regulatoren und zum anderen an die Membran von körpereigenen Zellen gebundene Regulatoren, dass die Aktivität von Komplement auf Wirtszellen verhindert oder aktiv inhibiert wird (Lambris *et al.*, 2008). Die Regulatoren der Komplementaktivierung („regulators of complement activation“ = RCA) sind sich strukturell sehr ähnlich und beinhalten den Komplementrezeptor 1 (CR1), Faktor H, das Faktor H-ähnliche Protein 1 („factor H-like protein-1“ = FHL-1), das C4-bindende Protein (C4BP), den Zerfallbeschleunigenden Faktor („decay-accelerating factor“ = DAF) und das Membran-Kofaktor-Protein („membrane cofactor protein“ = MCP). Die Komplementregulatoren destabilisieren entweder die C3-Konvertase (CR1, Faktor H, FHL-1, C4BP, DAF) und/oder fördern als Kofaktor die Faktor I-vermittelte Spaltung von C3b in iC3b (CR1, Faktor H, FHL-1, C4BP, MCP) (Abb. 1). CR1 ist auch ein Kofaktor für eine zusätzliche Faktor I-vermittelte Spaltung von iC3b zu C3d. Das strukturell verschiedene Regulatorprotein CD59 sowie Vitronektin und Clusterin verhindern die MAC-Bildung. Des Weiteren kontrolliert das Glykoprotein C1-Inhibitor die Aktivität von verschiedenen Enzymen, die an den ersten Schritten des CP und LP beteiligt sind. Ist einer der oben genannten Regulatoren in seiner Funktion eingeschränkt, können die körpereigenen Zellen vor der lytischen Wirkung nicht mehr ausreichend geschützt werden. Dies kann zu Entzündungsreaktionen und Schädigung von gesundem Gewebe führen (Zipfel *et al.*, 2006).

1.2.2.1. Regulation des AP durch Proteine der Faktor H-Familie

Die Regulation des AP ist von besonderer Bedeutung, da dieser Weg ständig durch die spontane Hydrolyse von C3 im geringen Maße aktiv ist und somit C3b kontinuierlich auf körpereigenen Zellen und eingedrungenen Pathogenen abgelagert wird. Durch die spontane Hydrolyse der Thioesterbindung in C3 entsteht C3(H₂O) mit

einer veränderten Konformation, die Faktor B die Bindung an C3 ermöglicht (Pangburn *et al.*, 1981). Durch diese Interaktion kann die Protease Faktor D den Faktor B in die Fragmente Bb und Ba spalten. Bb bleibt am C3(H₂O) gebunden. Der C3(H₂O)Bb-Komplex stellt die C3-Konvertase des AP in der flüssigen Phase dar. Diese Konvertase spaltet C3 in das Anaphylatoxin C3a und in C3b, welches kovalent an Zelloberflächen bindet (Sim *et al.*, 1981) und zusammen mit Faktor B erneut den C3bBb-Komplex bilden kann. Durch diese nun an die Zelloberfläche gebundene C3-Konvertase wird C3 weiter in aktives C3b umgewandelt, welches sich wiederum auf Zelloberflächen ablagert, um noch mehr C3-Konvertase zu bilden oder als Opsonin für Phagozyten zu dienen (Law & Levine, 1977). Die C3-Konvertase des AP wird durch Properdin stabilisiert (Fearon & Austen, 1975). In Folge dessen ist das Enzym länger aktiv und es entsteht eine Verstärkungsschleife, da neu gebildetes C3b den AP erneut induziert (Medicus *et al.*, 1976). C3b wird aber auch unverzüglich durch die Hydrolyse wieder inaktiviert, wenn es nicht an Zelloberflächen gebunden ist.

Der wichtigste Regulator des AP ist Faktor H, der sowohl in der Flüssigphase als auch auf Oberflächen die Komplementaktivierung reguliert. Faktor H bindet spezifisch an gesunde körpereigene Strukturen und schützt diese. Humane Krankheiten, die mit den Komplementregulatoren der Faktor H-Familie in Zusammenhang stehen, sind das atypische hämolytisch-urämische Syndrom (aHUS), die membranoproliferative Glomerulonephritis (MPGN Typ II) und die altersabhängige Makuladegeneration („age-related macula degeneration“ = ARMD) (Zipfel *et al.*, 2006). Bei den zur Faktor H-Familie gehörenden Mitgliedern handelt es sich um multifunktionelle Plasmaproteine, die vorwiegend in der Leber synthetisiert und dann mit Hilfe von Signalpeptiden in die Blutbahn sekretiert werden. Die Familie umfasst sieben Mitglieder: Faktor H, FHL-1 und FHR-1 bis FHR-5 („factor H-related protein“) (Zipfel *et al.*, 1999). Jedes dieser Proteine besteht aus repetitiven Untereinheiten, welche als „short consensus repeats“ (SCR) oder „complement control protein domains“ (CCP) bezeichnet werden. Ein SCR besteht aus ca. 60 Aminosäuren, welche zum Teil konserviert sind, wie z. B. vier Cysteine, zwei Proline und ein Tryptophan. Die globuläre Tertiärstruktur der einzelnen SCRs entsteht durch die Disulfidbrücken zwischen den konservierten Cysteinen (Barlow *et al.*, 1992). Die Gene der humanen Faktor H-Familie sind im Gencluster „regulators of complement activation“ (RCA) auf Chromosom 1q32 lokalisiert (Rodriguez de Cordoba *et al.*, 1999).

Der Komplementregulator Faktor H ist das am besten untersuchte Mitglied der Faktor H-Familie und wurde erstmals 1965 von Nilsson und Müller-Eberhard als β 1H-Globulin beschrieben (Nilsson & Mueller-Eberhard, 1965). Es ist ein 150 kDa großes Glykoprotein und wird in der Leber aber auch in Myoblasten, Fibroblasten, Nabelschnurzellen, Neuronen, Gliazellen und anderen Zellen synthetisiert (Zipfel *et al.*, 1999, Schlaf *et al.*, 2001). Im humanen Plasma beträgt die Faktor H-Konzentration ca. 500 μ g/ml. Faktor H besteht aus 20 SCRs, die in einer einzigen flexiblen Polypeptidkette aneinander gereiht sind (DiScipio, 1992) (Abb. 2). Die Hauptfunktion von Faktor H ist es, körpereigene Zellen bei Infektionen und Entzündungen vor der Komplementaktivierung zu schützen. Hierbei ist die Binefähigkeit von Faktor H an C3b, Heparin, Faktor B, Sialinsäure und Zelloberflächenrezeptoren von Bedeutung. Faktor H bindet C3b in den N-terminalen SCRs 1-4, in den SCRs 12-14 und in den C-terminalen SCRs 19-20 (Kühn *et al.*, 1995, Gordon *et al.*, 1995, Jokiranta *et al.*, 2000) und wirkt dann als Kofaktor für Faktor I bei der proteolytischen Spaltung von C3b in iC3b (Fearon & Austen, 1975, Whaley & Ruddy, 1976, Pangburn *et al.*, 1977). Des Weiteren konkurriert Faktor H mit Faktor B um die Bindung an C3b und inhibiert so die Bildung der C3-Konvertase (C3bBb) (Whaley & Ruddy, 1976).

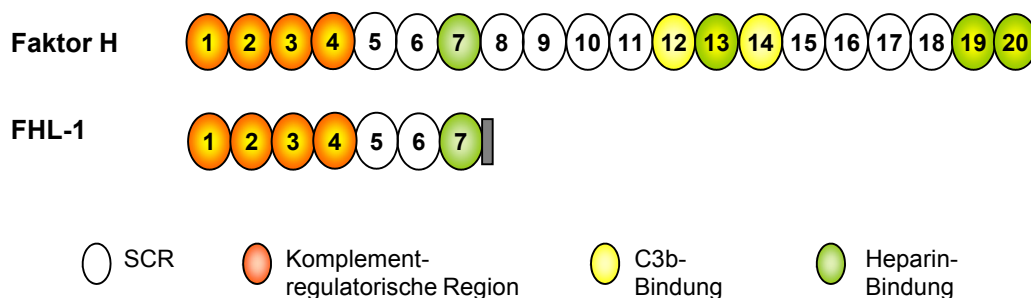


Abb. 2: Struktur und funktionelle Proteindomänen von Faktor H und FHL-1.

Faktor H besteht aus 20 „short consensus repeats“ (SCRs). Die komplementregulatorische Funktion ist in den 4 N-terminalen SCRs 1-4 lokalisiert (orange markiert). Faktor H bindet C3b in den SCRs 1-4, 12-14 sowie in 19 und 20 (gelb markiert). Die Bindung von Faktor H an Zellen wird u. a. über drei Heparin-Bindestellen in SCR 7, 13 sowie 19 und 20 vermittelt (grün markiert). FHL-1 entsteht durch alternatives Splicing des Faktor H-Gens und ist deshalb in den N-terminalen SCRs 1-7 identisch zu Faktor H. Der graue Balken am C-Terminus von FHL-1 repräsentiert die vier Aminosäuren, in denen sich FHL-1 von Faktor H unterscheidet.

Darüber hinaus kann Faktor H den Zerfall des C3bBb-Komplexes beschleunigen (Weiler *et al.*, 1976). Zwischen C3b auf körpereigenen und fremden Oberflächen kann Faktor H aufgrund der chemischen Umgebung des C3b unterscheiden. Faktor H erkennt ein Spektrum von Zelloberflächenmolekülen. Dazu gehören Glykosaminoglykane wie Heparin, Heparansulfat und Sialinsäure. Die Bindestellen für diese Liganden befinden sich in den SCRs 7, 9, 13 und 19-20 (Pangburn *et al.*, 1991, Ram *et al.*, 1998b, Blackmore *et al.*, 1998, Jokiranta *et al.*, 2005). Die Kofaktorfunktion für Faktor I sowie die Zerfall-beschleunigende Aktivität befindet sich in den SCRs 1-4 (Abb. 2), (Pangburn *et al.*, 1977, Kühn & Zipfel, 1996)).

Das aus sieben SCRs und vier zusätzlichen Aminosäuren am C-Terminus bestehende FHL-1 ist eine Spleißvariante des Faktor H-Gens (Estaller *et al.*, 1991). Durch alternatives Spleißen des Faktor H-Gens entstehen zwei Transkripte. Die sieben SCRs von FHL-1 werden durch die selben Exons wie bei Faktor H codiert. Die vier C-terminalen Aminosäuren sind im Exon 10 kodiert und werden ausschließlich für das FHL-1-Transkript genutzt. Die Plasmakonzentration des 42 kDa großen Proteins beträgt ca. 10-50 µg/ml. Es besitzt die Kofaktorfunktion für Faktor I (Misasi *et al.*, 1989) und Zerfall-beschleunigende Aktivität in den SCRs 1-4 (Kühn *et al.*, 1995, Kühn & Zipfel, 1996), sowie die Fähigkeit zur C3b- und Heparinbindung (Kühn *et al.*, 1995, Jokiranta *et al.*, 2000). Demnach sind aufgrund der fast identischen Struktur von Faktor H und FHL-1 auch die Funktionen der beiden Komplementregulatoren übereinstimmend (Zipfel *et al.*, 2002, Rodriguez de Cordoba *et al.*, 2004).

1.2.3. Komplementevasion

Nach dem Eindringen in den menschlichen Wirt wird jeder Mikroorganismus durch das Komplementsystem des Wirts attackiert. Viele pathogene Mikroorganismen können jedoch die Komplementaktivierung auf ihrer Oberfläche stoppen oder verzögern. Die Komplementevasion ist entweder durch die Rekrutierung bzw. die Imitation der humanen Komplementregulatoren auf der Pathogen-Oberfläche oder durch die Expression endogener Komplementregulatoren wie z. B. pathogener Proteasen und mikrobieller Komplementinhibitoren vermittelt (Zipfel *et al.*, 2002, Zipfel *et al.*, 2007, Lambris *et al.*, 2008). Als alternative Strategie der

Komplementevasion wird auch die Rekrutierung und Aktivierung von humanem Plasminogen zu Plasmin an der Bakterienoberfläche diskutiert (Rooijakkers & van Strijp, 2007).

Von einer wachsenden Zahl pathogener Mikroorganismen sind Komplementevasionsmechanismen bekannt (Tab. 1). Für die Hefe *C. albicans* wurde die Akquisition der zentralen Regulatoren der flüssigen Phase des AP Faktor H und FHL-1 sowie des Regulators des CP C4BP nachgewiesen (Meri *et al.*, 2002a, Meri *et al.*, 2004). Die Bindung humanener Komplementregulatoren wie Faktor H, FHL-1, und C4BP wurde auch für Pilze wie *Aspergillus fumigatus* (Vogl *et al.*, 2008, Behnsen *et al.*, 2008), für Gram-negative Bakterien wie *Borrelia burgdorferi* (Alitalo *et al.*, 2001, Kraiczy *et al.*, 2001), *Neisseria gonorrhoeae* (Ram *et al.*, 1998a), *Neisseria meningitidis* (Ram *et al.*, 1999), Gram-positive Bakterien wie *Streptococcus pyogenes* (Johnsson *et al.*, 1998, Kotarsky *et al.*, 1998), *Streptococcus pneumoniae* (Neeleman *et al.*, 1999), und Parasiten einschließlich *Onchocerca volvulus* (Meri *et al.*, 2002b), *Echinococcus granulosus* (Diaz *et al.*, 1997) sowie für den humanen Immundefizienz-Virus (Stoiber *et al.*, 1997) gezeigt. Bestimmte Viren produzieren sogar die löslichen Proteine selbst, die die Struktur und Funktion der Komplementregulatoren des Wirts nachahmen. Das „vaccinia virus complement-control protein“ = VCP besitzt strukturelle Ähnlichkeit zum humanen DAF (Murthy *et al.*, 2001) und zeigt wie das „smallpox inhibitor of complement enzymes“ = SPICE eine Zerfall beschleunigende Aktivität und Kofaktor-Aktivität (Sfryroera *et al.*, 2005).

Der Vorteil der Rekrutierung von humanen Komplementregulatoren besteht zum einen in der guten Verfügbarkeit der vom Wirt produzierten Regulatoren und der strukturellen Ähnlichkeit der einzelnen Komplementregulatoren (SCRs), die es dem gleichen mikrobiellen Oberflächenprotein häufig ermöglichen, verschiedene humane Komplementregulatoren zu binden (Tab. 1). Zum anderen behalten die gebundenen Wirtsproteine meist ihre regulatorische Aktivität (Zerfall beschleunigende Aktivität, Kofaktor-Aktivität) und schützen die Mikroorganismen so gegen die komplementvermittelte Phagozytose und/oder Lyse. Trotz dieses allgemeinen Wirkmechanismus treten innerhalb der bisher identifizierten Komplementregulatoren-bindenden pathogenen Oberflächenproteine kaum Sequenz- oder Strukturähnlichkeiten auf (Zipfel *et al.*, 2007).

Tab. 1: Mikrobielle Komplementregulatoren-bindende Proteine (Auswahl).

| Pathogen | Oberflächen-protein | Interagierende Wirtsproteine | Referenz |
|---------------------------------|-----------------------|------------------------------|---|
| PILZE | | | |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | unbekannt | Faktor H, FHL-1, FHR-1, C4BP | (Vogl <i>et al.</i> , 2008, Behnsen <i>et al.</i> , 2008) |
| <i>Candida albicans</i> | Gpm1p = CaCRASP-1 | Faktor H, FHL-1 | diese Arbeit |
| BAKTERIEN | | | |
| <i>Borrelia burgdorferi</i> | BbCRASP-1 - BbCRASP-5 | Faktor H, FHL-1, FHR-1 | (Kraiczy <i>et al.</i> , 2001, Haupt <i>et al.</i> , 2007) |
| <i>Borrelia hermsii</i> | FhbA = BhCRASP-1 | Faktor H, FHL-1 | (Rossmann <i>et al.</i> , 2007, Hovis <i>et al.</i> , 2008) |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | Por1A | Faktor H | (Ram <i>et al.</i> , 1998a) |
| | Por1B | Faktor H | (Madico <i>et al.</i> , 2007) |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Tuf = PaCRASP-1 | Faktor H, FHR-1 | (Kunert <i>et al.</i> , 2007) |
| | Hic | Faktor H | (Janulczyk <i>et al.</i> , 2000) |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | PspC | Faktor H | (Dave <i>et al.</i> , 2001) |
| | Fba | Faktor H, FHL-1 | (Pandiripally <i>et al.</i> , 2003) |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> | M-Protein | Faktor H, FHL-1, FHR-1, C4BP | (Jarva <i>et al.</i> , 2003) |
| | Scl1 | Faktor H, FHR-1 | (Caswell <i>et al.</i> , 2008) |
| | YadA | Faktor H | (China <i>et al.</i> , 1993) |
| VIREN | | | |
| HIV | gp41, gp120 | Faktor H | (Stoiber <i>et al.</i> , 1997) |
| Westnil-Virus | NS1 | Faktor H | (Chung <i>et al.</i> , 2006) |

Ein neuartiger Mechanismus der Komplementevasion ist in *Staphylococcus aureus* bekannt geworden. Dieses Bakterium bindet humanes Plasminogen an Plasminogenrezeptoren der Bakterienoberfläche. Durch die bakterielle Staphylokinase wird Plasminogen zur aktiven Serinprotease Plasmin aktiviert (Rooijackers & van Strijp, 2007). Die humane Protease Plasmin besitzt ein breites Substratspektrum und spaltet u. a. auch IgG, C3b und iC3b (Rooijackers *et al.*, 2005).

1.2.4. Bedeutung des Komplementsystems für *C. albicans*

C. albicans aktiviert alle drei humanen Komplementwege (Kozel *et al.*, 1996, Ip & Lau, 2004) aufgrund natürlich vorkommender humaner anti-Mannan IgG (CP), Kohlenhydraten auf der *C. albicans*-Oberfläche (LP) und spontaner Initiation (AP), was die Ablagerung von opsonisierenden Komplementfragmenten auf der *C. albicans*-Oberfläche zur Folge hat. *In vivo* konnte bei Patienten mit einer chronischen mukokutanen Kandidosis eine C3-Ablagerung auf *C. albicans* gezeigt werden (Sohnle *et al.*, 1976). C3 bindet vor allem in Form von C3b über Amidbindungen an die *C. albicans*-Zellwand (Kozel *et al.*, 1987) und ist essentiell für die Phagozytose von *C. albicans* (Morrison & Cutler, 1981). Des Weiteren führt die Komplementaktivierung durch *C. albicans* zur Bildung von chemotaktischen Spaltfragmenten (Ray & Wuepper, 1976, Thong & Ferrante, 1978), jedoch bildet sich der Membranangriffskomplex aufgrund der dicken *C. albicans*-Zellwand nicht (Kozel, 1996). In Tiermodellen für experimentelle Kandidosis wurde nachgewiesen, dass das Komplementsystem für die Resistenz gegen disseminierte Kandidosis von Bedeutung ist. Dabei sind vor allem der alternative Weg und späte Komponenten des Komplements für die Limitierung und das Überleben einer *C. albicans*-Sepsis wichtig. Meerschweinchen mit defektem CP (C4-Defizienz) sind genauso resistent gegenüber disseminierter Kandidosis wie C4-suffiziente Meerschweinchen, wohingegen Meerschweinchen mit durch CVF- („cobra venom factor“) gehemmtem AP eine erhöhte Mortalität im Vergleich zu unbehandelten Meerschweinchen zeigen (Gelfand *et al.*, 1978). Darüber hinaus zeigen auch Mäuse mit einer C5-Defizienz eine verminderte Resistenz gegenüber disseminierter Kandidosis (Morelli & Rosenberg, 1971, Hector *et al.*, 1982). Dies wird mit der Funktion des Anaphylatoxins C5a bei der Rekrutierung von Neutrophilen erklärt, die für die Resistenz gegenüber disseminierter Kandidosis essentiell sind. Das Komplementsystem ist auch für die Resistenz gegenüber kutaner Kandidosis wichtig. C5-defiziente Kaninchen oder mit CVF-behandelte Kaninchen entwickelten keine Entzündungsantwort, und dies ermöglichte *C. albicans* in das subkutane Fett einzuwachsen (Ray & Wuepper, 1978). Jedoch wird auch die Beteiligung von anti-Mannan IgG bei der Aktivierung des alternativen Weges als erste Verteidigungslinie bei disseminierter Kandidosis diskutiert (Zhang & Kozel, 1998). Monoklonale anti-beta-Mannan-Antikörper schützen

sogar vor disseminierter Kandidosis, da sie sehr effizient C3 an die Hefe-Oberfläche binden was eine verstärkte Phagozytose und Abtötung von *C. albicans* zur Folge hat (Han *et al.*, 2001). *C. albicans* hat allerdings auch Resistenzmechanismen entwickelt, um die Effekte des Komplementsystems zu umgehen (Kapitel 1.2.3.). Des Weiteren besitzt *C. albicans* Rezeptoren für C3-Spaltprodukte (C3d, iC3b), die große Ähnlichkeit zu den Säuger-Komplementrezeptoren CR2 und CR3 besitzen (Edwards *et al.*, 1986). Die Komplementrezeptoren werden im Zusammenhang mit der Virulenz verschiedener *Candida*-Spezies diskutiert, da die meisten pathogenen *Candida*-Spezies Komplementrezeptoren auf ihrer Oberfläche tragen (Heidenreich & Dierich, 1985) und die Expression der Rezeptoren durch Wachstumsbedingungen wie Temperatur (Eigentler *et al.*, 1989) und Glukose-Konzentration (Hostetter *et al.*, 1990) beeinflusst werden. Darüber hinaus ist eine *C. albicans*-Mutante mit verminderter iC3b-Bindefähigkeit/CR3-ähnlicher Aktivität avirulent (Ollert *et al.*, 1990). Als mögliche Virulenz-Mechanismen werden in Verbindung mit den Komplementrezeptoren die Adhäsion an Wirtszellen (Gustafson *et al.*, 1991), die Migration und die Eisen-Akquisition (Moors *et al.*, 1992) vorgeschlagen.

1.3. Das Fibrinolysesystem / Plasmin(ogen)system

Das Fibrinolysesystem umfasst ca. 15 Proteine, die an intra- und extravaskulären Prozessen beteiligt sind. Unter physiologischen Bedingungen sind die Koagulation und die Fibrinolyse durch Aktivatoren, Inhibitoren, Kofaktoren und Rezeptoren streng reguliert. Dadurch wird sowohl die Fluidität des Blutes gesichert als auch der Blutverlust verhindert (Cesarman-Maus & Hajjar, 2005). Fibringerinnsel werden durch die Koagulation infolge einer Verletzung oder Infektion gebildet, verschließen sofort verletzte Blutgefäße und „immobilisieren“ eingedrungene Mikroorganismen und verhindern so ihre Ausbreitung (Sun, 2006). Plasmin ist die zentrale Serinprotease im Fibrinolysesystem, welches die Fibrin-Netzwerke wieder auflöst. Darüber hinaus ist Plasmin in der Lage, ein breites Spektrum an Substraten wie Elastin, Prokollagen, Laminin und andere Komponenten der extrazellulären Matrix zu degradieren (Lijnen & Collen, 1995). Die inaktive Vorstufe Plasminogen ist ein einzelsträngiges Glykoprotein mit einer Größe von 92 kDa. Es wird in der Leber

synthetisiert und zirkuliert im Plasma in einer Konzentration von ca. 180-200 µg/ml. Plasmin besteht aus einer schweren Kette (65 kDa), die fünf Schleifenstrukturen enthält und einer leichten Kette (25 kDa), die das aktive Zentrum (Ser₇₄₀, Asp₆₄₅, His₆₀₂) beinhaltet (Abb. 3). Die Struktur des Moleküls wird durch mehrere Disulfidbrücken stabilisiert. Die Hauptfunktionen der aktiven Serinprotease Plasmin sind die Fibrinolyse, die Förderung der Migration von Zellen durch den Abbau verschiedener ECM-Komponenten und die Aktivierung von Pro-Hormonen und Wachstumsfaktoren (Lähtenmäki *et al.*, 2001). Darüber hinaus aktiviert Plasmin Pro-Kollagenasen und Matrix-Metalloproteasen und trägt so zum Kollagenabbau bei. Diese Degradation der extrazellulären Matrix erleichtert so die Zellmigration, wie z. B. die Wanderung von Immunzellen aus der Blutbahn ins Gewebe (Vassalli *et al.*, 1992). Um Fehlfunktionen dieses Systems zu verhindern, wird die Aktivierung von Plasminogen streng durch humane Aktivatoren und Inhibitoren reguliert (Bergmann & Hammerschmidt, 2007).

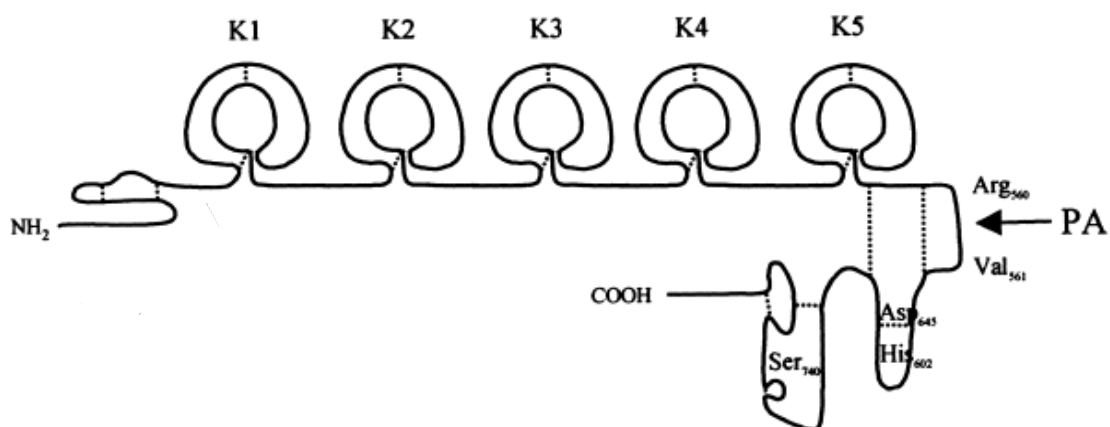


Abb. 3: Struktur von Plasmin(ogen) (Lähtenmäki *et al.*, 2001).

Plasminogen ist ein einzelsträngiges Protein und wird durch Plasminogenaktivatoren (PA) in zwei Ketten gespalten und so zu Plasmin umgewandelt. Durch zahlreiche Disulfidbrücken (gestrichelte Linien) werden die fünf Schleifenstrukturen (K1-K5) in der schweren Kette ausgebildet sowie die leichte und schwere Kette miteinander verbunden. Das aktive Zentrum (Ser₇₄₀, Asp₆₄₅, His₆₀₂) befindet sich in der leichten Kette.

1.3.1. Aktivierung und Regulation von Plasmin(ogen)

Die Aktivierung von Plasminogen erfolgt durch die humanen Serinproteasen u-PA („urokinase-type plasminogen activator“ = Urokinase), t-PA („tissue-type plasminogen

activator“) oder Kallikrein. Das einkettige Plasminogen wird dabei zwischen Arg₅₆₀ und Val₅₆₁ gespalten und es entsteht das zweikettige Plasmin (Abb. 3). Die Aktivatoren u-PA und t-PA werden von verschiedenen eukaryontischen Zellen wie z. B. Endothelzellen während einer Entzündung gebildet und sezerniert (Lähteenmäki *et al.*, 2001). Es existieren aber auch sehr effiziente bakterielle Plasminogenaktivatoren wie z. B. die Staphylokinase, die Streptokinase und die Pla-Protease. Sowohl Plasminogen als auch Plasmin können an Fibrin und Zelloberflächen binden. Durch diese Immobilisierung wird die Plasminogenaktivierung gefördert (Mangel *et al.*, 1990). Das membrangebundene Plasmin hat eine höhere Aktivität und wird durch Plasmininhibitoren wie z. B. α 2-Antiplasmin oder α 2-Makroglobulin schlechter abgebaut. Die humanen Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren („PAI“) PAI-1 und PAI-2 hemmen u-PA und t-PA und verhindern somit die Aktivierung von Plasminogen (Kruithof, 1988). Dagegen werden die bakteriellen Plasminogenaktivatoren nicht durch humane PAIs gehemmt (Lähteenmäki *et al.*, 2001).

1.3.2. Plasmin(ogen)rezeptoren

Plasmin und Plasminogen binden an Zelloberflächen mittels spezifischer Rezeptoren, die durch unterschiedliche Affinität für ein Gleichgewicht zwischen Verstärkung bzw. Verzögerung der Proteolyse sorgen. Diese Rezeptoren verfügen häufig über C-terminale Lysine, welche mit den Schleifenstrukturen von Plasmin(ogen) wechselwirken. Aufgrund der Rezeptoren wirkt die proteolytische Aktivität von Plasmin gezielt, lokalisiert und vorübergehend. Humane Plasminogen-bindende Zellen sind z. B. Endothelzellen und Blutzellen (Plow *et al.*, 1995). Auch Tumorzellen exprimieren Plasminogenrezeptoren und Plasminogenaktivatoren (Mignatti & Rifkin, 1993). Damit erwerben sie proteolytische Aktivität, die ihnen die Invasion in umliegende Gewebe und Metastasierung ermöglicht. Das selbe Prinzip nutzen auch Krankheitserreger wie *B. burgdoferi*, *S. pneumoniae* und *Haemophilus influenzae* indem sie Plasminogen an ihrer Oberfläche binden (Tab. 2, (Lähteenmäki *et al.*, 2001)). Darüber hinaus interagieren viele invasive pathogene Bakterien mit den Aktivatoren und Inhibitoren des humanen Plasminsystems. Es wird vermutet, dass diese Mechanismen dem Erwerb zusätzlicher proteolytischer Aktivität dienen,

mit deren Hilfe umliegende Wirtszellen geschädigt werden und das Eindringen in tiefere Gewebsschichten möglich wird (Plow *et al.*, 1995). Auch für die pathogenen Pilze *C. albicans* und *A. fumigatus* wurde die Fähigkeit der Plasminogenbindung gezeigt (Jong *et al.*, 2003, Crowe *et al.*, 2003, Behnsen *et al.*, 2008). In einem Proteomics-Experiment wurden mehrere Plasminogen-bindende Proteine von *C. albicans* identifiziert (Crowe *et al.*, 2003).

Tab. 2: Mikrobielle Plasmin(ogen)-bindende Proteine (Auswahl).

| Pathogen | Oberflächenprotein | Referenz |
|---------------------------------|---|---|
| PILZE | | |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | unbekannt | (Behnsen <i>et al.</i> , 2008) |
| <i>Candida albicans</i> | Enolase | (Jong <i>et al.</i> , 2003) |
| | Gpm1 | diese Arbeit, (Crowe <i>et al.</i> , 2003) |
| | Tsa1, Cta1, Tdh3, Tef1, Pgk1, Adh1, Fba1 | (Crowe <i>et al.</i> , 2003) |
| | Enolase | (Fox & Smulian, 2001) |
| BAKTERIEN | | |
| <i>Borrelia burgdorferi</i> | OspA | (Fuchs <i>et al.</i> , 1994) |
| <i>Borrelia hermsii</i> | BhCRASP1=FhbA | (Rossmann <i>et al.</i> , 2007) |
| <i>Haemophilus influenzae</i> | Aspartase | (Sjöström <i>et al.</i> , 1997) |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Tuf | (Kunert <i>et al.</i> , 2007) |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | Enolase | (Bergmann <i>et al.</i> , 2001) |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> | GAPDH | (Winram & Lottenberg, 1996) |
| | Enolase | (Pancholi & Fischetti, 1998) |
| | M-like protein PAM | (Berge & Sjöbring, 1993) |

1.4. Ziele der Arbeit

Zu Beginn der Untersuchungen war bekannt, dass *C. albicans* humane Komplementregulatoren binden kann (Zipfel *et al.*, 2002). Bei den postulierten Rezeptoren auf der Hefe-Oberfläche musste es sich um Proteine handeln, da die Bindung von Faktor H durch die Behandlung von *C. albicans* mit Proteasen verhindert werden konnte (Zipfel, persönliche Kommunikation). Ziel dieser Arbeit war

es daher, Faktor H- und FHL1-bindende Proteine von *C. albicans* zu identifizieren, funktionell zu charakterisieren und ihre Rolle in der Pathogenese von *C. albicans* zu analysieren. Zunächst sollten geeignete Kandidaten durch das Screening eines Proteom-Arrays identifiziert werden. Das Gen des interessantesten Vertreters sollte anschließend kloniert und rekombinant exprimiert werden. Bindungsstudien sollten daraufhin durchgeführt werden, um die Interaktionen der humanen Komplement-regulatoren Faktor H- und FHL1 sowie weiterer humaner Serumproteine wie C4BP und Plasminogen mit dem rekombinanten Protein *in vitro* zu charakterisieren. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob die an CaGpm1p gebundenen humanen Serumproteine funktionell aktiv sind und ihre regulatorische Funktion beibehalten. Von besonderer Bedeutung war der Nachweis der Oberflächenlokalisierung des Kandidaten auf *C. albicans* mit Hilfe spezifischer polyklonaler Antiseren. Schließlich sollte die Funktion der Faktor H- und FHL-1-Bindung bei der Pathogenese von *C. albicans* mit Hilfe einer *C. albicans*-Nullmutante auch *in vivo* evaluiert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Mikrobiologische Arbeiten

2.1.1. Verwendete Stämme

Die *C. albicans*-Stämme, die in dieser Arbeit verwendet bzw. konstruiert wurden, sind in Tabelle 3 aufgelistet. Der *C. albicans* Wildtyp SC5314 diente als Vergleichsstamm und CAI-4 wurde für die Mutationsexperimente verwendet. Für die Klonierung mit dem „ZeroBlunt™Topo®-Kit“ (Invitrogen, Karlsruhe) wurden kompetente „One Shot TOP10-*Escherichia coli*-Zellen“ (Invitrogen) verwendet. Für alle weiteren Klonierungen wurde der *E. coli*-Stamm DH5α (Sambrook, 1989) genutzt. Zur Expression von rekombinanten Proteinen wurde der *Pichia pastoris*-Stamm X33 (Invitrogen) benutzt.

Tab. 3: Verwendete und im Rahmen dieser Arbeit konstruierte *C. albicans*-Stämme.

| Stamm | Genotyp | Referenz |
|----------------|--|-----------------------|
| SC5314 Wildtyp | | (Fonzi & Irwin, 1993) |
| CAI-4 | Δ ura3::imm434/ Δ ura3::imm434, isogenisch zu SC5314 | (Fonzi & Irwin, 1993) |
| CAP1 | Δ gpm1::hisG-URA3-hisG/GPM1, Δ ura3::imm434/ Δ ura3::imm434 | diese Arbeit |
| CAP2 | Δ gpm1::hisG/GPM1, Δ ura3::imm434/ Δ ura3::imm434 | diese Arbeit |
| CAP3 | Δ gpm1::hisG/ Δ gpm1::hisG-URA3-hisG, Δ ura3::imm434/ Δ ura3::imm434 | diese Arbeit |
| CAP4 | Δ gpm1::hisG/ Δ gpm1::hisG, Δ ura3::imm434/ Δ ura3::imm434 | diese Arbeit |
| CAP5 | Δ gpm1::hisG/GPM1::hisG-URA3-hisG, Δ ura3::imm434/ Δ ura3::imm434 | diese Arbeit |

2.1.2. Kultivierung und Konservierung der Stämme

Die *C. albicans*-Stämme wurden in Voll- oder Minimalmedium bei 30°C auf einem Rotationsschüttler (180 rpm, Multitron Infors) angezogen. Das Vollmedium basierte auf 1 % (w/v) Hefeextrakt und 2 % (w/v) Pepton, (YP). Als Kohlenstoffquellen wurden entweder 2 % (w/v) Glukose (D) oder 3 % (v/v) Glycerol (G) und/oder 2 % (v/v)

Ethanol verwendet. Das Sabouraud-Minimalmedium basierte auf 1 % (w/v) Pepton aus Casein (Sab) und wurde mit den angezeigten Kohlenstoffquellen ergänzt. Die Kultivierung auf adäquaten Festmedien (Zugabe von 2 % Agar-Agar (w/v) zum Medium) erfolgte ebenfalls bei 30°C in einem Brutschrank (Heraeus Instruments). Das Wachstum wurde auch auf anderen Kohlenstoffquellen wie 2 % (w/v) Galaktose (Gal), 2 % (w/v) Maltose (Mal), 2 % (w/v) Saccharose (Sac), 2 % (w/v) Raffinose (Raf) und 2 % (w/v) Kaliumacetat untersucht. Zur Isolierung von *C. albicans*-Ura⁻-Segreganten wurde *C. albicans* auf 5-Fluoroorotsäure-enthaltendem Minimalmedium ausplattiert. Das Hyphenwachstum wurde durch einen Temperaturwechsel von 30°C zu 37°C in RPMI 1640 (Cambrex, Verviers, Belgien) induziert.

Alle *E. coli*-Stämme wurden in LB-Medium (1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl) bei 37°C über Nacht auf einem Rotationsschüttler (180 rpm) angezogen. Die Kultivierung auf adäquatem Festmedium (Zugabe von 1,5 % Agar-Agar (w/v) zum Medium) erfolgte ebenfalls bei 37°C in einem Brutschrank. Abhängig von den Resistenzeigenschaften der verwendeten Klone wurde das Medium mit 50 µg/ml Kanamycin und 100 µg/ml Carbenicillin (*E. coli*-Top10 mit pCR4Blunt-Derivaten) oder 25 µg/ml Zeocin (DH5α mit pPICZαB-Derivaten) versetzt. Die Kultivierung von *P. pastoris* erfolgte bei 30°C entweder in den Flüssigmedien YPD, BMGY oder BMMY bei 180 rpm, wie im „EasySelect™ *Pichia* Expression Kit“ (Invitrogen) beschrieben, oder auf YPD-Agarplatten. Direkt nach der Transformation wurde *P. pastoris* auf YPDS-Festmedium (YPD mit 1 M Sorbitol) kultiviert, dem 100 µg/ml Zeocin zugesetzt wurden.

Zur dauerhaften Konservierung der Mikroorganismen wurden Glycerolkulturen in 25 % Glycerol (v/v) angelegt und bei -80°C aufbewahrt.

2.1.3. Bestimmung der Wachstumsraten von *C. albicans*

Zur Bestimmung des Wachstums der *C. albicans*-Stämme in Minimal- und Vollmedium wurden 5×10^6 Zellen/ml aus der jeweiligen stationären Vorkultur in 50 ml frisches Flüssigmedium überimpft. Die Stämme wurden bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Um die Zellzahl zu bestimmen, ist stündlich eine Probe entnommen worden, die in Formaldehyd fixiert und mittels THOMA-Zählkammer

ausgezählt wurde. Aus diesen Daten wurden die Teilungsraten und die Generationszeiten der Stämme nach folgenden Formeln ermittelt:

$$\text{Teilungsrate} \quad v = \frac{\log N_2 - \log N_1}{\log 2 (t_2 - t_1)} \cdot h^{-1} \qquad \text{Generationszeit} \quad g = \frac{1}{v} \cdot h$$

$t_2 - t_1$ Zeitspanne während der logarithmischen Phase

$N_2 - N_1$ Zunahme der Zellzahl

2.2. Molekularbiologische Arbeiten

2.2.1. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde bei der Klonierung des *CaGPM1*-Gens in pPICZ α B, bei der Konstruktion der Mutagenese-Plasmide pG0 bis pG3 sowie zur Überprüfung von *E. coli*-, *P. pastoris*- und *C. albicans*-Transformanden eingesetzt. Alle PCRs fanden im „Mastercycler epgradientS“ (Eppendorf, Hamburg) statt. Für die PCRs wurden je 5 pmol Primer (Tab. 4) verwendet.

Bei der Amplifizierung von *CaGPM1* für nachfolgende Klonierungsschritte wurde 1 μ l der 1:100 verdünnten genomischen *C. albicans*-DNA in einem 20 μ l PCR-Ansatz verwendet. Die PCR erfolgte mit dem „Phusion High-Fidelity PCR Kit“ (New England Biolabs (NEB), Frankfurt/Main) mit den unter Tabelle 5A beschriebenen Bedingungen. Als Polymerase wurde 1 unit Phusion verwendet. Alle weiteren benötigten Reagenzien wurden, wie vom Hersteller beschrieben, eingesetzt.

Zur Überprüfung von Transformanden wurde Koloniematerial in 50 μ l A. dest resuspendiert, für 10 min bei 95°C lysiert und danach abzentrifugiert. Die PCR fand im 10 μ l PCR-Maßstab statt und wurde mit 0,5 μ l lysiertem Koloniematerial und 1 unit Taq-Polymerase (QBiogene, Heidelberg) unter den in Tabelle 5B beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Es kamen sowohl *GPM1*- als auch marker- (U2) und vektorspezifische Primer (Tab. 4) in unterschiedlichen Kombinationen zur Anwendung.

Tab. 4: Verwendete Oligonukleotide (Primer) für die Klonierung, Sequenzierung und Mutagenese von CaGpm1p.

Die Restriktionsschnittstellen sind fett gedruckt und die unterstrichenen Sequenzen sind komplementär zu genomischer *C. albicans*-DNA.

| Name | Sequenz | Restriktase | DNA-Matrize |
|---------------------------|---|--------------|-----------------------------|
| GPM1- <i>EcoRI</i> -fw | 5'- GAATTC <u>GATGCCAAAGTTAGTTTTAGT</u> -3' | <i>EcoRI</i> | <i>CaGPM1</i> von SC5314 |
| GPM1- <i>XbaI</i> -re | 5'- TCTAGAT <u>ATTTCTTTTGACCTTGAGCAG</u> -3' | <i>XbaI</i> | <i>CaGPM1</i> von SC5314 |
| 5'AOX-fw | 5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3' | - | pPICZαB |
| 3'AOX-re | 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3' | - | pPICZαB |
| M13-fw | 5'-AGGGTTTTCCAGTCACGACGTT-3' | - | pCR4Blunt |
| M13-re | 5'-GAGCGGATAACAATTCACACAGG-3' | - | pCR4Blunt |
| SP1- <i>SacI</i> | 5'-ATATATCG AGCTC <u>GTTAGATCACCTTTTACTCTCAAG</u> -3' | <i>SacI</i> | <i>CaGPM1</i> von SC5314 |
| SP2- <i>KpnI</i> | 5'-ATATATGC GGTACC <u>ATCAAAGGATAATTGGAGCAAGG</u> -3' | <i>KpnI</i> | <i>CaGPM1</i> von SC5314 |
| SP3- <i>Sall</i> | 5'-ATATATGC GTGCAGC <u>TTGGCCCGAACTGAAGAATTCA</u> -3' | <i>Sall</i> | <i>CaGPM1</i> von SC5314 |
| SP4- <i>PstI</i> | 5'-ATAAATGACT GCAG <u>GATATAAGTGTCGATGATTCTAG</u> -3' | <i>PstI</i> | <i>CaGPM1</i> von SC5314 |
| SP5- <i>KpnI</i> | 5'-ATATATGC GGTACC <u>CTTAATTTCTGAGTCTAACAGAAC</u> -3' | <i>KpnI</i> | <i>CaGPM1</i> von SC5314 |
| SP6- <i>Sall</i> | 5'-ATATATGC GTGCAGC <u>TGTAATGTGGATGTTAGTTTGCT</u> -3' | <i>Sall</i> | <i>CaGPM1</i> von SC5314 |
| SP7- <i>PstI</i> | 5'-ATAAATGACT GCAG <u>CAATTGGTAACTCAATATATACTC</u> -3' | <i>PstI</i> | <i>CaGPM1</i> von SC5314 |
| U2 | 5'-GTGTTACGAATCAATGGCACTACAGC-3' | | <i>URA3</i> von SC5314 |

Tab. 5: Verwendete PCR-Programme.

| | A | B |
|------------------|------------------------------------|--------------------------------|
| | Amplifizierung von genomischer DNA | Überprüfung von Transformanden |
| Denaturierung | 98°C für 8 s | 94°C für 1 min |
| Primeranlagerung | 64°C für 20 s | 55°C für 1 min |
| Verlängerung | 72°C für 30 s | 72°C für 3 min |
| Zyklenzahl | 30 | 35 |

2.2.2. Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die elektrophoretische Auftrennung von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten erfolgte im „Wide Mini-Sub®Cell-System“ von Bio-Rad (München) in einem 1%-igen Agarosegel, dem 10 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt wurden unter Verwendung von TBE-Laufpuffer (0,1 M Tris-Base, 0,1 M H₃BO₃, 2 mM EDTA). Als Größenstandard wurde „SmartLadder“ (Eurogentec, Köln) mitgeführt. Die aufgetrennte DNA wurde mittels UV-Transiluminator „GeneGenius Bio Imaging System“ (Syngene, Merck, Schwalbach) visualisiert. Für die Klonierung von DNA wurde die entsprechende Bande aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit Hilfe des „GFX DNA and Gel Band Purification-Kits“ (GE Healthcare, Freiburg) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.2.3. Restriktion und Ligation von DNA

DNA-Restriktionen wurden mit Restriktionsenzymen von Fermentas (St. Leon-Rot) und NEB durchgeführt und entsprechend den Anweisungen des Herstellers eingesetzt. Für die Ligation glatter bzw. überhängender Enden wurde das „ZeroBlunt Topo-Kit“ (Invitrogen) bzw. die T4-DNA-Ligase (Fermentas) nach dem Protokoll des jeweiligen Herstellers verwendet.

2.2.4. Transformation von *E. coli*

Die pCR4Blunt-Derivate wurden nach der Ligation in „One Shot TOP10“ *E. coli*-Zellen (Invitrogen) nach Anweisungen des Herstellers transformiert. Die Transformation der pPICZαB-Derivate in den *E. coli*-Stamm DH5α geschah mit Hilfe der Hitzeschock-Methode wie in (Sambrook, 1989) beschrieben. Je 100 µl der transformierten Klone wurden auf antibiotikahaltigem LB-Agar ausplattiert und anschließend für ca. 24 h bei 37°C inkubiert.

2.2.5. Plasmidpräparation aus *E. coli*

Für die Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA aus 2 ml *E. coli*-Übernachtskultur wurde das „Invisorb Spin Plasmid Mini-Kit“ (Invitex, Berlin) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Größere Plasmidmengen wurden aus einer 100 ml *E. coli*-Kultur unter Verwendung des „HiSpeed Plasmid Midi-Kits“ (Qiagen, Hilden) isoliert.

2.2.6. DNA-Sequenzierung

Zur Überprüfung der in dieser Arbeit konstruierten Plasmide wurden diese sequenziert (Sanger *et al.*, 1977). Die Analyse der DNA erfolgte im 16-Kapillarsequenzierer „3100 Genetic Analyzer“ von ABI Prism (Applied Biosystems, Darmstadt). Für die Aufbereitung der Proben wurde der „Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing-Kit“ (Applied Biosystems) verwendet.

2.2.7. Transformation von *P. pastoris*

Die Transformation von *P. pastoris* erfolgte mittels Elektroporation (Gene Pulser TM, Bio-Rad, München). Kompetente *P. pastoris*-Zellen wurden nach Angaben des „EasySelect™ *Pichia* Expression-Kits“ (Invitrogen) erzeugt, mit 10 µg linearisierter DNA gemischt und in eine eiskalte 0,2 mm Elektroporationsküvette (PeqLab) überführt. Das Gemisch wurde für 5-10 min auf Eis inkubiert, bevor die Elektroporation mit folgenden Parametern: 1,5 kV, 25 µF und 200 Ω durchgeführt wurde. Danach wurden die Transformanten in 1 ml 1 M Sorbitol aufgenommen und in einem Röhrchen 1-2 h bei 30°C ohne zu schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf YPDS-Agarplatten mit Zeocin ausplattiert und 3-5 Tage bei 30°C inkubiert.

2.2.8. Transformation von *C. albicans*

Die Transformation von *C. albicans* erfolgte in Gegenwart von Lithiumacetat (Berman, 2007). Die *C. albicans*-Zellen wurden mit 5 µg DNA transformiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C wurden die resultierenden Ura⁺-Transformanten auf SabD- oder SabGE-Agarplatten für 3 Tage bei 30°C inkubiert und so selektiert.

2.2.9. Klonierungsstrategie von *CaGPM1*

Das Phosphoglycerat-Mutase-Gen *GPM1* von *C. albicans* wurde durch PCR unter Verwendung genomischer DNA von *C. albicans* SC5314 und den Primern GPM1-*EcoRI*-fw und GPM1-*XbaI*-re (Tab. 4) amplifiziert. Das resultierende 760 bp-DNA-Fragment enthielt die komplette für *CaGPM1* kodierende Region sowie flankierend zusätzlich eine 5'-*EcoRI*- und eine 3'-*XbaI*-Restriktionsschnittstelle. Das DNA-Fragment wurde zunächst in den *E. coli*-Klonierungsvektor pCR4Blunt-TOPO (Invitrogen) subkloniert und nachfolgend in die *EcoRI*- und *XbaI*-Stellen des *P. pastoris*-Expressionsvektors pPICZαB (Invitrogen) kloniert. Mit dem resultierenden Plasmid pPIC-*GPM1* wurde anschließend *P. pastoris* transformiert. Im Ergebnis wurde der Stamm selektiert, der CaGpm1p exprimiert.

2.2.10. Disruption und Reintegration des *CaGPM1*-Gens

Das *CaGPM1*-Gen wurde mittels der „*hisG-URA3-hisG*-Kassette“ (Fonzi & Irwin, 1993) disruptiert. Die Strategie der Disruption und Reintegration ist schematisch in Abbildung 4 dargestellt. Zunächst wurde die 5'-Region von *CaGPM1* durch PCR unter Verwendung chromosomaler DNA von *C. albicans* SC5314 und den Primern SP1-*SacI* und SP2-*KpnI* amplifiziert. Das resultierende 325 bp-PCR-Produkt wurde mit *SacI/KpnI* geschnitten und in den Disruptionsvektor pMB7 (Fonzi & Irwin, 1993) kloniert, was Plasmid pG0 ergab. Die Primer SP3-*SalI* und SP4-*PstI* wurden für die Amplifizierung der 3'-Region verwendet. Das 334 bp-Produkt wurde mit *SalI* und *PstI* geschnitten und anschließend in Plasmid pG0 kloniert, was in pG1 resultierte. Für die Gendisruption wurde das Plasmid pG1 mit *SacI* and *PstI* behandelt. Das 3,3 kb-

SacI/PstI-Fragment von Plasmid pG1 enthält den *URA*-Blaster, der von kurzen Sequenzen des 5'- und 3'-Endes von *CaGPM1* flankiert wird, sowie Teilbereiche des Promotors bzw. Terminators und wurde für die Transformation von *C. albicans* Ura⁻ Stamm CAI-4 verwendet.

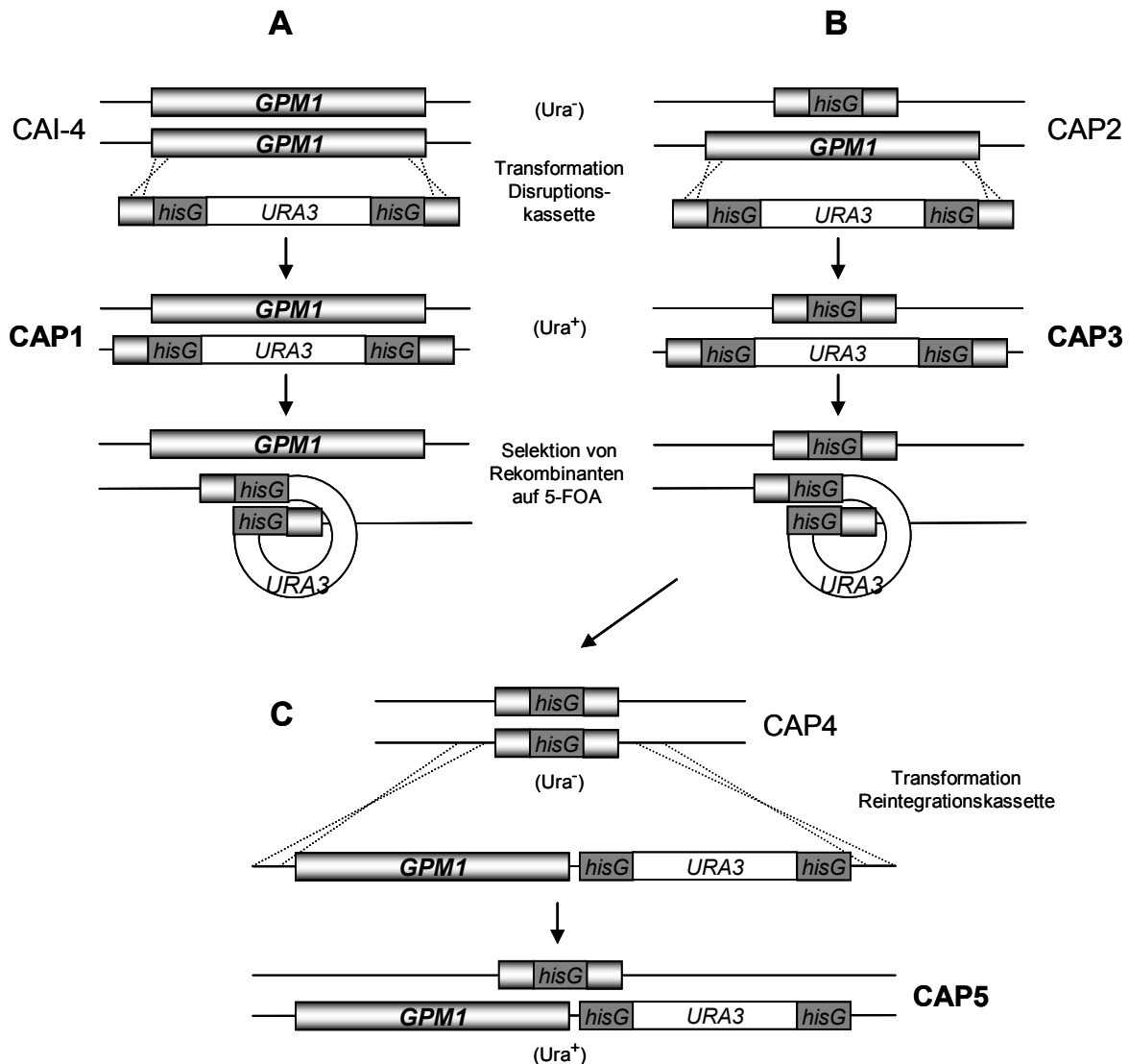


Abb. 4: Strategie der Disruption und Reintegration des *GPM1*-Gens in *C. albicans*.

CaGPM1 wurde mittels *URA*-Blaster (Fonzi & Irwin, 1993) deletiert. Nach Konstruktion der Disruptionskassette durch Klonierung der 5'- und 3'-Enden von *CaGPM1* in flankierende Bereiche der *URA3*-Kassette wurde diese zur Erzeugung der heterozygoten Mutante CAP1 (A) transformiert und zielgerichtet durch homologe Rekombination integriert. Auf 5-FOA wurde der *URA*-Blaster durch intrachromosomale Rekombination der einander homologen *hisG*-Sequenzen entfernt und anschließend erneut zur Herstellung der homozygoten Mutante CAP3 (B) eingesetzt. (C) Die Reintegration von *CaGPM1* erfolgte nach Entfernen der Disruptionskassette auf 5-FOA durch Transformation der Reintegrationskassette, welche das komplette *CaGPM1* und den *URA3*-Marker enthält.

Im ersten Schritt wurde so ein Allel von *CaGPM1* durch die *hisG-URA3-hisG* Kasette ersetzt (CAP1). Stamm CAP1 wurde der *URA*-Blaster durch intrachromosomale Rekombination auf 5-FOA entfernt und führte so zum *Ura*⁻ Stamm CAP2. Eine Transformation von CAP2 mit dem gleichen Disruptionskonstrukt führte zur Isolierung einer *Cagpm1*-Nullmutante (CAP3). Es wurden erneut *Ura*⁻ Segreganten selektiert (CAP4).

Für die homologe Reintegration des *CaGPM1* Gens wurde *CaGPM1* durch PCR mit den Primern SP1-*SacI* und SP5-*KpnI* amplifiziert. Das resultierende 1220 bp-PCR-Produkt wurde mit *SacI/KpnI* geschnitten und in den Disruptionsvektor pMB7 kloniert, was in Plasmid pG2 resultierte. Die Primer SP6-*Sall* und SP7-*PstI* wurden für die Amplifikation der Downstream-Region verwendet. Das resultierende 332 bp-Produkt wurde mit *Sall* und *PstI* geschnitten und in Plasmid pG2 kloniert, was Plasmid pG3 ergab. *CaGPM1* wurde in den Nullmutanten-Stamm CAP4 durch Transformation mit dem 5,6 kb großen *SacI/PstI*-Insert von pG3 (trägt *CaGPM1* Gen, upstream- und downstream-Regionen für die homologe Rekombination sowie das *URA3* Gen als Selektionsmarker) wieder eingefügt, was in CAP5 resultierte.

2.3. Proteinbiochemische und immunologische Arbeiten

2.3.1. Expression rekombinanter Proteine

CaGpm1p wurde rekombinant als ein His-getaggttes Protein in dem *P. pastoris*-Stamm X33, wie im „EasySelect™ Pichia Expression-Kit“ (Invitrogen) beschrieben, exprimiert. Die Proteinexpression wurde 3 Tage lang mit 1 % Methanol induziert. Daraufhin wurde der Kulturüberstand geerntet und das rekombinante CaGpm1p wurde mit 80 % (NH₄)₂SO₄ präzipitiert. FHL-1 (SCR 1–7) und die rekombinanten Deletionskonstrukte von Faktor H (SCRs 1–5, SCRs 1–6, SCRs 8–11, SCRs 11–15, SCRs 15–18 und SCRs 19–20) wurden in Insektenzellen, wie in (Kühn & Zipfel, 1995) beschrieben, exprimiert.

2.3.2. Chromatographie

Alle verwendeten rekombinanten Proteine besaßen einen C-terminalen Histidin-Tag (6xHis) und wurden daher mittels Nickelchelate-Affinitätschromatographie („immobilized metal ion affinity chromatography“, IMAC) aufgereinigt. Das Pellet von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -gefälltem rekombinanten CaGpm1p wurde dafür in 15 ml Bindepuffer (10 mM Na_2HPO_4 , 10 mM NaH_2PO_4 , 500 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 10 % Glycerol, pH 7,4) aufgelöst. Diese Proteinlösung wurde dann mit Hilfe der Gelfiltrationssäule „HiPrep™26/10“ (GE Healthcare) an der „ÄKTA™-FPLC“-Anlage („fast protein liquid chromatography“, GE Healthcare) entsalzt. Es wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren. Insektenkulturüberstände, die FHL-1 und Faktor H-Derivate enthielten, wurden in Bindepuffer 1:5 verdünnt. Alle rekombinanten Proteinlösungen wurden durch einen 0,8-µm-Filter filtriert und anschließend mit einer „Econo Pump“-Peristaltikpumpe (Bio-Rad) bei 4°C mit einer Geschwindigkeit von 0,5 ml/min auf eine 1 ml „HisTrap™ HP“-Säule (GE Healthcare) aufgetragen. Die „HisTrap™ HP“-Säule wurde danach in das „ÄKTA™-FPLC“-System integriert, mit Bindepuffer gewaschen und mit Elutionspuffer (10 mM Na_2HPO_4 , 10 mM NaH_2PO_4 , 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol, 10 % Glycerol, pH 7,4) eluiert. Die Vor- und Nachbehandlung der Säulen und der „ÄKTA™-FPLC“-Anlage wurden wie von den Herstellern empfohlen durchgeführt. Die aufgereinigten Proteine wurden anschließend in Dulbecco's PBS (DPBS) w/o Ca & Mg (Cambrex, Verviers, Belgien) durch „centricon Plus20“-Konzentratoren (Millipore, Schwalbach) vom Imidazol befreit und aufkonzentriert. Nachfolgend fand am „NanoDrop-Spektrophotometer“ (ND-1000 Spectrophotometer, PqLab) die Proteinbestimmung statt.

2.3.3. SDS-PAGE

Die Proteine wurden mittels „Mini-PROTEAN 3 Cell“-Anlage (Bio-Rad, München) aufgetrennt. In Abhängigkeit von den erwarteten Größen der elektrophoretisch aufzutrennenden Proteine wurden 10 oder 12%-ige SDS-Polyacrylamidgele verwendet. Die Zusammensetzung der Gele und die Anweisungen für verwendete Puffer wurden dem Handbuch der Firma Bio-Rad entnommen. Die Elektrophorese fand bei 150-200 V vorwiegend im nicht reduzierenden Zustand statt. Zu den Proben

wurde nichtreduzierender Probenpuffer (Sambrook, 1989) zugegeben. In einigen Fällen mussten die Proben mit reduzierendem Probenpuffer (Roti®-Load 1, Roth) versetzt werden; in diesem Fall wurde die Probe vor dem Aufragen für 5 min auf 95°C erhitzt. Als Größenmarker wurden „SeeBlue“ (Invitrogen) und „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ (Fermentas) verwendet.

2.3.4. Silberfärbung

Die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden mittels Silberfärbung nachgewiesen. Zuerst wurde das Proteingel für 30 min fixiert (30 % Ethanol, 30 % Essigsäure). Danach wurde es für je 10 min mit 20 % Ethanol und A. dest gewaschen. Anschließend fand die Sensibilisierung mit frisch angesetztem $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (0,2 g/l) für 1 min statt. Das Gel wurde dreimal 20 s mit A. dest gewaschen und 30 min mit 2 g/l AgNO_3 behandelt. Danach wurde erneut mit A. dest gespült und anschließend entwickelt (Entwicklungslösung: 0,7 ml/l 37%-iges Formaldehyd, 30 g/l Na_2CO_3 , 10 mg/l $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$). Nach Erreichen der gewünschten Intensität wurde die Reaktion gestoppt (Stopplösung: 50 g/l Tris Base, 2,5 % Essigsäure). Nach einer Inkubation in Trockenlösung (10 % Ethanol, 5 % Glycerol) wurden die Silbergele zwischen zwei Cellophanfolien (Roth) in einem Trockenrahmen eingespannt.

2.3.5. Western-Blot

Für die Westernblotanalyse wurde auf das Anfärben der Proteingele verzichtet. Der Transfer von Proteinen aus den Acrylamidgelen auf eine Nitrocellulosemembran (Protran, Schleicher und Schuell, Dassel) erfolgte mit dem „semi-dry“-Blotsystem von Keutz-Labortechnik (Reiskirchen). Auf drei Lagen Whatman-Papier (Whatman, Dassel) wurden die Membran, darauf das Gel und darauf wiederum drei Lagen Whatman-Papier blasenfrei gelegt. Alle Komponenten wurden vorher im Transferpuffer (5,5 g/l Tris, 2,9 g/l Glycin, 20 % Methanol, 0,1 % SDS) eingetaucht. Der Transfer erfolgte bei 48 mA (1 mA/cm² Gel). Die auf Nitrocellulose geblotteten Proteine wurden mit der ECL-Methode („enhanced chemiluminescence“) detektiert. Hierfür wurde die Membran zuerst in PBS-II (10 mM Na_2HPO_4 , 18 mM KH_2PO_4 ,

27 mM KCl, 1,4 M NaCl, pH 7,4), das mit 2,5 % BSA (Applichem, Darmstadt) und 1 x Rotiblock (Roth) versetzt war, über Nacht bei 4°C inkubiert. Der primäre Antikörper (Tab. 6) wurde in der oben beschriebenen Blockierungslösung verdünnt und für ca. 2 h bei RT inkubiert. Die Membran wurde fünfmal 10 min mit PBS-T (PBS-II + 0,05 % Tween20) gewaschen und anschließend mit dem sekundären Antikörper inkubiert (Tab. 6). Der 2. AK, ein HRP-Konjugat, wurde wie der 1. AK verdünnt. Die Inkubation erfolgte hierbei ca. 1 h bei RT. Nach letztmaligem Waschen der Membran mit PBS-T (5 x 10 min) erfolgte die Inkubation der Membran in Detektionslösung (100 µl 250 mM Luminol, 44 µl 90 mM Cumarinsäure, 2 ml 1 M Tris-HCl, 6 µl H₂O₂, 17,8 ml A. dest) und die Detektion der entstandenen Lichtsignale mit einem Röntgenfilm (Fuji) im „Curix60“-Entwickler der Firma AGFA (Köln).

2.3.6. Proteinbindungsstudien

2.3.6.1. ProtoArray

Das „ProtoArray Yeast Proteome PPI-Kit“ (Invitrogen), welches 4088 aufgereinigte rekombinante und auf einem Objektträger gespottete Hefeproteine der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* enthält, wurde für die Identifizierung Faktor H- und FHL-1-bindender Proteine nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Arrays wurden entweder mit Faktor H (Calbiochem) oder FHL-1 (je 6 µg) hybridisiert. Für die spezifische Detektion von gebundenem Faktor H und FHL-1 auf dem Proteinarray wurden die monoklonalen Antikörper B22 und L20 (Oppermann *et al.*, 2006) (gegen SCR 5 bzw. SCR 19 von Faktor H gerichtet) mit Alexa Fluor® 647 (Molecular Probes, Eugene, OR) nach den Vorschriften des Herstellers markiert. Anschließend wurden die Arrays mit einem Fluoreszenz Microarray Scanner (GenePix 4000B, Molecular Devices) gescannt. Signifikante Interaktionen wurden durch die Analyse der erhaltenen Daten mittels der „ProtoArray Prospector Software“ (Invitrogen) identifiziert. Zusätzliche Arrays wurden ausschließlich mit den Antikörpern hybridisiert, um die Hintergrundreaktivität der Antikörper zu bestimmen.

Tab. 6: Verwendete Antikörper für Western-Blot, ELISA, Durchflußzytometrie, Immunfluoreszenz.

| Primäre Antikörper | | | Sekundäre Antikörper | |
|---|------------|---|--|------------|
| Spezifität | Verdünnung | Bemerkung | Spezifität | Verdünnung |
| Maus-anti-Histidin (PentaHis, Qiagen) | 1:1000 | monoklonal; Polyhistidin- Tag | Ziege-anti-Maus-HRP (DAKO) | 1:1000 |
| Ziege-anti-Faktor H (Calbiochem) | 1:1000 | polyklonal; Mitglieder der FH-Familie | Kaninchen-anti-Ziege- HRP (DAKO) | 1:1000 |
| Kaninchen-anti-Gpm1 (diese Arbeit) | 1:1000 | polyklonal; CaGpm1p | Schwein-anti-Kaninchen- HRP (DAKO) | 1:1000 |
| Ziege-anti-C3 (Calbiochem) | 1:1000 | polyklonal; C3- Spaltprodukte | Kaninchen-anti-Ziege- HRP (DAKO) | 1:1000 |
| Ziege-anti-Plasminogen (Acris) | 1:1000 | polyklonal; Plasminogen | Kaninchen-anti-Ziege- HRP (DAKO) | 1:1000 |
| Maus-anti- γ Tubulin (P.Hemmerich, FLI Jena) | 1:100 | monoklonal; γ Tubulin | Ziege-anti-Maus-HRP (DAKO) | 1:500 |
| Kaninchen-anti- Fibrinogen (Calbiochem) | 1:1000 | polyklonal; Fibrinogen | Schwein-anti-Kaninchen- HRP (DAKO) | 1: 1000 |
| Kaninchen-anti-CaGpm1 (diese Arbeit) | 1:50 | polyklonal; CaGpm1p | Ziege-anti-Kaninchen- Alexa-488 (Molecular Probes) | 1:200 |
| Kaninchen-anti-Gpm1 (diese Arbeit) | 1:100 | polyklonal; CaGpm1p | Schwein-anti-Kaninchen- FITC (DAKO) | 1:100 |

2.3.6.2. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

Für ELISAs wurde CaGpm1p (0,25 µg/Well in Carbonatbicarbonat Puffer, Sigma) auf einer Mikrotiterplatte (Platte mit halber Oberfläche, Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande) bei RT über Nacht immobilisiert. Unspezifische Bindestellen wurden mit

2 % BSA in PBS-II für 2 h bei RT blockiert. Nach der Inkubation mit dem Liganden-Protein (0,75 µg/Well) für 2 h bei RT wurden die Wells dreimal mit PBS-T Puffer (PBS-II mit 0,05 % Tween 20) gewaschen und mit dem primären Antiserum (Tab. 6, in Blocklösung) für 1 h bei RT inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS-T, wurde HRP-gekoppeltes Antiserum (Tab. 6, in Blocklösung) hinzugefügt und für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde das Substrat o-Phenylendiamindihydrochlorid (Sigma) hinzugegeben. Die Reaktion wurde nach 5-20 min mit 2 M H₂SO₄ gestoppt und die optische Dichte wurde bei 490 nm in einem ELISA-Platten-Reader (SpektraMax 190, Molecular Devices) gemessen.

2.3.7. Immunfluoreszenz und Durchflußzytometrie

C. albicans Hefe- oder Hyphe-Zellen (10⁸) wurden bei RT für 30 min in DPBS mit 2 % BSA inkubiert. Nach Blockierung der unspezifischen Bindestellen wurden die Zellen bei 4°C über Nacht mit Kaninchen-anti-CaGpm1p-Antiserum (Tab. 6) oder mit Präimmunserum inkubiert. Diese Antiseren stammten von der Immunisierung von Kaninchen, die die Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) nach ihrem Standardprotokoll mit in dieser Arbeit aufgereinigtem rekombinantem CaGpm1p durchgeführt hat. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal mit Blockierungspuffer gewaschen. Ein Ziege-anti-Kaninchen-Antiserum, markiert mit Alexa Fluor[®] 488 (Tab. 6), wurde in Blockierungspuffer verdünnt und bei RT für 60 min hinzugegeben. Die Zellen wurden dreimal gewaschen und mit einem Laserscanning Mikroskop (LSM 510 META, Zeiss) untersucht.

Die *C. albicans* Hefe-Zellen wurden auch mit Hilfe der Durchflußzytometrie analysiert. Nach Inkubation bei 4°C für 30 min mit CaGpm1p-Antiserum (Tab. 6, in 1 % BSA-DPBS) wurden die *C. albicans*-Zellen mit 1 % BSA-DPBS gewaschen. FITC-markiertes Schwein-anti-Kaninchen-Antiserum wurde als sekundärer Antikörper (Tab. 6, in 1 % BSA-DPBS) verwendet. Nach Inkubation bei 4°C für 30 min wurden die Zellen mit 1 % BSA-DPBS gewaschen und im Durchflußzytometer (LSR II, BD Biosciences) untersucht. Das Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht (FSC und SSC) wurde für die Identifizierung der Zellen genutzt und die Fluoreszenzereignisse von 10.000 Zellen wurden gezählt.

2.3.8. Herstellung der Zytoplasma- und Zellwand-Fraktion von *C. albicans*

Für die Herstellung der Zellwand-Fraktion wurde *C. albicans* in einer YPGE-Kultur bei 30°C über Nacht angezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet und bei -20°C gelagert. Nach der Resuspendierung des Pellets in DPBS, ergänzt mit FY-Proteaseinhibitor-Mix (Serva), wurden die Zellen durch Glasperlen in einem „Mini-BeadBeater“ (Biospec Products) lysiert, gefolgt von drei Gefrier- und Auftau-Zyklen. Für die Isolierung der zytoplasmatischen Proteine wurde das Zell-Lysat zentrifugiert und der Überstand wurde gesammelt. Die Zelltrümmer wurden in DPBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde zehnmal wiederholt. Proteine aus dem Zellwand-Pellet wurden mit reduzierendem Probenpuffer und durch Inkubation bei 99°C für 5 min extrahiert.

2.4. Funktionale Studien

2.4.1. Kofaktor Assay

Die Kofaktoraktivität der Komplementregulatoren Faktor H und FHL-1, gebunden an CaGpm1p, wurde wie beschrieben (Meri *et al.*, 2002a) durchgeführt. CaGpm1p wurde auf der Oberfläche einer Mikrotiterplatte (Platte mit halber Oberfläche, Corning) immobilisiert, und Faktor H (Calbiochem, 0,2 µg/Well) oder FHL-1 (0,2 µg/Well) wurde an diese Matrix gebunden. Nach umfangreichem Waschen mit PBS-II wurden C3b (Calbiochem, 0,4 µg/Well) und Faktor I (Calbiochem, 0,8 µg/Well) hinzugefügt. Nach Inkubation bei 37°C wurde der Überstand durch SDS-PAGE aufgetrennt und die C3-Degradationsprodukte wurden durch Western-Blot unter Verwendung eines anti-C3-Antiserum und einem HRP-gekoppelten anti-Maus Antikörper analysiert (Tab. 6).

2.4.2. Aktivierung von Plasminogen und Bestimmung der Plasmin-Aktivität

Die Plasmin-Aktivität wurde wie beschrieben bestimmt (Bergmann *et al.*, 2005). Rekombinantes CaGpm1p (0,25–2 µg/Well) wurde auf der Oberfläche einer Mikrotiterplatte (Platte mit halber Oberfläche, Corning) immobilisiert. Nach der Blockierung mit 2 % BSA in PBS-II wurde Plasminogen (Chromogenix, Milano, Italien; 0,6 µg/Well) für 2 h bei RT hinzugefügt. Ungebundenes Plasminogen wurde durch Waschen mit PBS-II entfernt. Der Plasminogenaktivator u-PA (Chemicon, Hofheim; 4 ng/Well) und das chromogene Substrat S-2251 (D-Valyl-leucyl-lysine-p-nitroanilide dihydrochloride, Sigma; 150 µg/Well) in 0,32 M Tris-HCl, 1,77 M NaCl, pH 7,5, wurden hinzugegeben. Die Plasmin-Aktivität wurde bei 37°C in Intervallen von 30 min durch die Aufnahme der Absorption bei 405 nm (SpektraMax 190, Molecular Devices) bestimmt.

Für den Fibrinogen-Degradationsassay wurde in gleicher Weise verfahren, als Substrat diente jedoch Fibrinogen (Calbiochem, 0,5 µg/Well). Nach Inkubation bei 37°C wurden Aliquots der Überstände zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen und anschließend durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die Fibrinogen Degradationsprodukte wurden durch Western-Blot unter Verwendung eines anti-Fibrinogen-Antiserums und einem HRP-gekoppelten anti-Kaninchen-Antikörper (Tab. 6) analysiert.

2.4.3. *Candida*-ELISA

Für *Candida*-ELISAs wurden *C. albicans*-Hefe-Zellen aus einer Übernachtskultur mit PBS-II gewaschen, in Carbonatbicarbonat Puffer (Sigma) auf 1×10^7 Zellen/ml verdünnt und auf einer Mikrotiterplatte (MaxiSorb, Nunc) bei 4°C über Nacht immobilisiert. Nach einmal Waschen mit PBS-T wurden unspezifische Bindestellen mit 1 x Roti-Block (Roth) in PBS-II (Blockierungslösung) für 2 h bei RT blockiert. Nach der Inkubation mit 20 % normalem humanen Serum/EDTA (NHS in Blockierungslösung versetzt mit 0,05 % Tween 20 (Block-T) und 10 mM EDTA) für 1 h bei 37°C wurden die Wells dreimal mit PBS-T gewaschen und mit dem primären

Antiserum (Tab. 6, in Block-T) für 1 h bei RT inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS-T wurde HRP-gekoppeltes Antiserum (Tab. 6, in Block-T) hinzugefügt und für 1 h bei RT inkubiert. Der *Candida*-ELISA wurde wie in Kapitel 2.3.6.2. beschrieben mit o-Phenylendiamindihydrochlorid (Sigma) und 2 M H₂SO₄ entwickelt und ausgelesen.

2.4.4. Virulenztest

Die Virulenz von *C. albicans* ist im embryonierten Hühnerei getestet worden. Es wurden zunächst Vorkulturen der *C. albicans*-Stämme in Sabouraud-Medium mit Glycerol und ohne Glukose angezogen. Die *C. albicans*-Zellen wurden dann dreimal mit 0,9 M NaCl gewaschen und auf 1 x 10⁹ Zellen/ml eingestellt. Die Infektion der für 10 Tage angebrüteten Hühnereier erfolgte am Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie/ HKI Jena in der Abteilung Mikrobielle Pathogenitätsmechanismen wie in (Härtl *et al.*, 1995) beschrieben. Jeweils 1 x 10⁸ *C. albicans*-Zellen wurden auf die Chorionallantoismembran der Hühnerembryonen appliziert. Jeder *C. albicans*-Stamm ist in 10 Eiern eingesetzt worden. Das Überleben der Embryonen wurde über 8 Tage beobachtet.

2.5. Verwendete Software

Die Software „GenePix Pro“ (Molecular Devices) sowie „Propector v1.0“ (Invitrogen) diente der Analyse des „ProtoArrays“ (Invitrogen). Alle Sequenzen der Phosphoglycerat-Mutase und weiterführenden Informationen wurden folgenden Datenbanken entnommen: „Candida Genome Database“ (URL: <http://www.candidagenome.org/>), „Saccharomyces Genome Database“ (URL: <http://www.yeastgenome.org/>), „Stanford Genome Technology Center“ (URL: <http://www-sequence.stanford.edu/group/candida/>) und „Medline PubMed“ (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>). Die Primer wurden mit Hilfe der Software-Programme „Oligonucleotide Properties Calculator“ (URL: <http://www.basic.northwestern.edu>) und „Primer Design Cybergene AB“ (URL: <http://www.cybergene.se>) entworfen und überprüft. Der „Clone Manager“ (Sci-Ed

Software) wurde für die Planung der Klonierungsstrategie von *CaGPM1* und der Überprüfung der sequenzierten Klone verwendet. Mit Hilfe der „UNICORNTM“ Software (GE Healthcare) wurde die „ÄKTATM-FPLC“-Anlage gesteuert. Das Software-Programm „Clustal W2“ (URL: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>) diente der Erstellung von Sequenz-Alignments und Kladogrammen.

3. Ergebnisse

3.1. Identifizierung von ScGpm1p als ein Faktor H- und FHL-1-bindendes Protein

Die humanen Komplementregulatoren Faktor H und FHL-1 binden an die humanpathogene Hefe *C. albicans* (Meri *et al.*, 2002a) und auch an *S. cerevisiae* (Zipfel, persönliche Kommunikation). Um die Hefe-Proteine zu identifizieren, die Faktor H und FHL-1 binden, wurde ein Proteinarray von *S. cerevisiae* verwendet (Abb. 5).

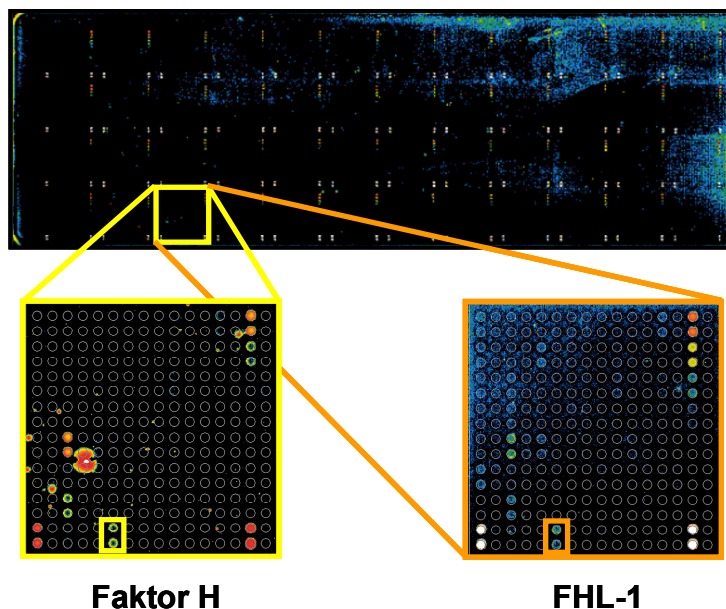


Abb. 5: Identifizierung von ScGpm1p als ein Faktor H- und FHL-1-bindendes Protein.

Ein Proteinarray mit 4088 rekombinanten Proteinen der Hefe *S. cerevisiae* wurde mit Faktor H oder alternativ mit FHL-1 inkubiert. Zwei positive Spots (YKL152C als Duplikat gespotted), welche die Phosphoglycerat-Mutase repräsentieren, wurden identifiziert. Die Experimente wurden dreimal wiederholt, ein repräsentatives Ergebnis ist gezeigt.

Dieser Array bestand aus 4088 rekombinanten *S. cerevisiae*-Proteinen und repräsentierte mehr als 80 % des *S. cerevisiae*-Proteoms. Mit diesem Proteom-Ansatz wurden vier Faktor H-bindende Proteine (YDR047W, YKL152C, YGR191W, YBL024W) und drei FHL-1-bindende Proteine (YDR047W, YKL152C, YBL024W) identifiziert (Tab. 7). Alle drei FHL-1-bindenden Proteine banden auch Faktor H, YGR191W band spezifisch nur Faktor H und nicht FHL-1. In einer *in silico*-Analyse konnte innerhalb der identifizierten Proteinsequenzen kein gemeinsames Bindemotiv gefunden werden. Spot YKL152C, der Faktor H und FHL-1 band, stellte die

Phosphoglycerat-Mutase ScGpm1p dar. Das homologe *C. albicans*-Gpm1p zeigte mit 78 % Identität höchste Homologie zu den *S. cerevisiae*-Proteinen (Tab. 7). Gpm1p wurde als besonderes Protein erachtet, da es in *C. albicans* kürzlich auch als Plasminogen-bindendes Protein identifiziert wurde (Crowe *et al.*, 2003).

Tab. 7: Mittels „ProtoArray“ identifizierte Interaktionen von Faktor H und FHL-1 mit *S. cerevisiae*-Proteinen.

| <i>S. cerevisiae</i> | <i>C.-albicans</i> -Homologon | | Funktion | Eigenschaften |
|-----------------------|--------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|--|
| YKL152C = ScGpm1p | CaGpm1p | 78 % Identität 87 % Ähnlichkeit | Phosphoglycerat-Mutase | in Zytoplasma und Zellwand lokalisiert, bindet Plasminogen |
| YDR047W = ScHem12p | CaHem12p | 70 % Identität 81 % Ähnlichkeit | Uroporphyrinogen-Decarboxylase | in Zytoplasma und Zellkern lokalisiert |
| YBL024W = ScNcl1p | Hypothet. Protein CaO19.518 | 55 % Identität 72 % Ähnlichkeit | tRNA (Cytosin-5-) Methyltransferase | im Zellkern lokalisiert |
| YGR191W = ScHip1p | putative Aminosäure-permease | 48 % Identität 67 % Ähnlichkeit | Histidin-Permease | in Plasmamembran integriert |

3.2. Klonierung, rekombinante Expression und Aufreinigung von Gpm1p aus *C. albicans*

Um die Interaktion von Gpm1p mit Faktor H und FHL-1 für *C. albicans* zu bestätigen, wurde das Gpm1p von *C. albicans* (CaGpm1p) kloniert und rekombinant in *P. pastoris* exprimiert. Zunächst wurde das durch PCR amplifizierte *CaGPM1* in den *E. coli*-Klonierungsvektor pCR4Blunt-TOPO subkloniert, durch Kolonie-PCR, Restriktion und Sequenzierung überprüft und anschließend in den *P. pastoris*-Expressionsvektor pPICZ α B kloniert und überprüft (Abb. 6).

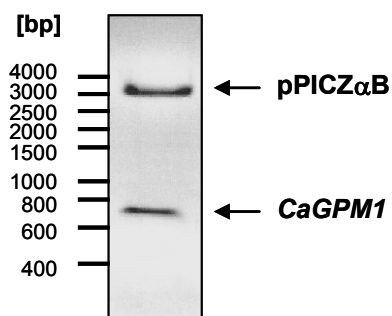


Abb. 6: Restriktion des pPICZ α B-CaGPM1-Konstrukts.

Das in dieser Arbeit hergestellte Konstrukt wurde mit *Eco*RI und *Xba*I geschnitten. Anschließend wurden die entstandenen Fragmente in einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid-Färbung detektiert. Als Marker wurde „SmartLadder“ verwendet.

Die Proteinexpression in dem in dieser Arbeit konstruierten *P. pastoris*-CaGpm1p-Expressionsstamm wurde mit Methanol induziert, und durch das α -Signalpeptid wurde CaGpm1p in den Kulturüberstand sekretiert. Eine C-terminale Fusion von sechs Histidin-Resten (His-Tag) mit *CaGPM1* ermöglichte die anschließende Aufreinigung durch Nickelchelate-Affinitätschromatographie und den Nachweis von CaGpm1p im Western-Blot. Der Kulturüberstand und verschiedene Fraktionen, die bei der Affinitätschromatographie erhalten wurden, wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Silber-Färbung analysiert (Abb. 7).

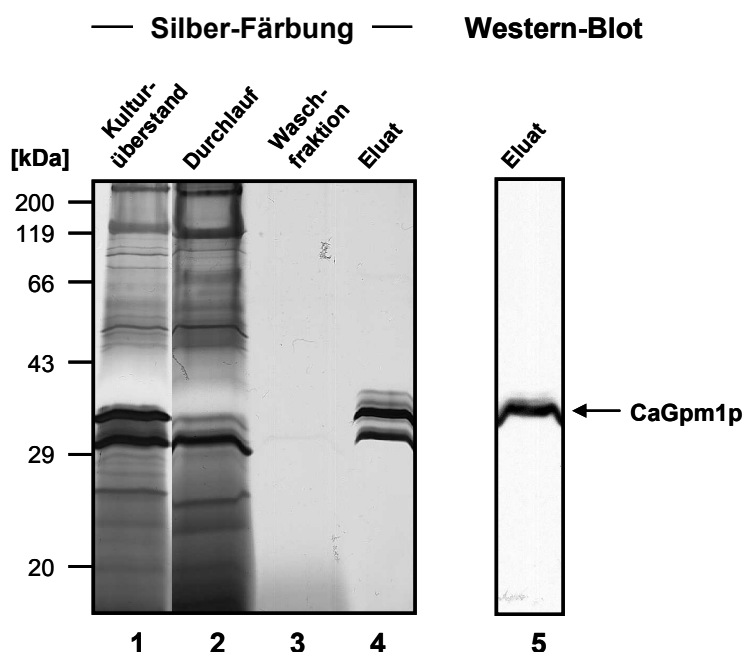


Abb. 7: Rekombinante Expression von CaGpm1p.

CaGpm1p wurde kloniert und rekombinant in *P. pastoris* als ein His-getagtes Protein exprimiert und durch Nickelchelate-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Der *P. pastoris*-Kulturüberstand sowie die Durchlauf-, Wasch- und Eluatfraktionen der Chromatographie wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Silber-Färbung analysiert (Spuren 1–4). Das Eluat wurde darüber hinaus durch Western-Blot mit einem anti-His-Antikörper (Spur 5) analysiert.

Zwei Hauptbanden mit einer Mobilität von 36 bzw. 31 kDa wurden im Kulturüberstand und in der Eluat-Fraktion detektiert. Der Western-Blot mit einem anti-

His-Antikörper (Abb. 7, Spur 5) identifizierte die 36 kDa Bande als das rekombinante CaGpm1p Protein. Die 31 kDa Bande ist wahrscheinlich ein Degradationsprodukt, welches keinen His-Tag besitzt.

3.3. Bindung der humanen Plasmaproteine Faktor H, FHL-1 und Plasminogen an CaGpm1p

Die Bindung von Faktor H und FHL-1 an rekombinantes CaGpm1p wurde durch ELISA untersucht. CaGpm1p wurde auf der Mikrotiterplatte immobilisiert und aufgereinigter Faktor H bzw. FHL-1 wurden hinzugefügt. Beide Immunregulatoren banden an CaGpm1p (Abb. 8). CaGpm1p wurde kürzlich als Plasminogen-bindendes Protein identifiziert (Crowe *et al.*, 2003) und diese Interaktion wurde für das rekombinante Protein bestätigt (Abb. 8). Der Regulator des klassischen Weges C4BP hat nicht an immobilisiertes CaGpm1p gebunden. Faktor H, FHL-1 und auch Plasminogen interagierten mit rekombinantem und immobilisierten CaGpm1p.

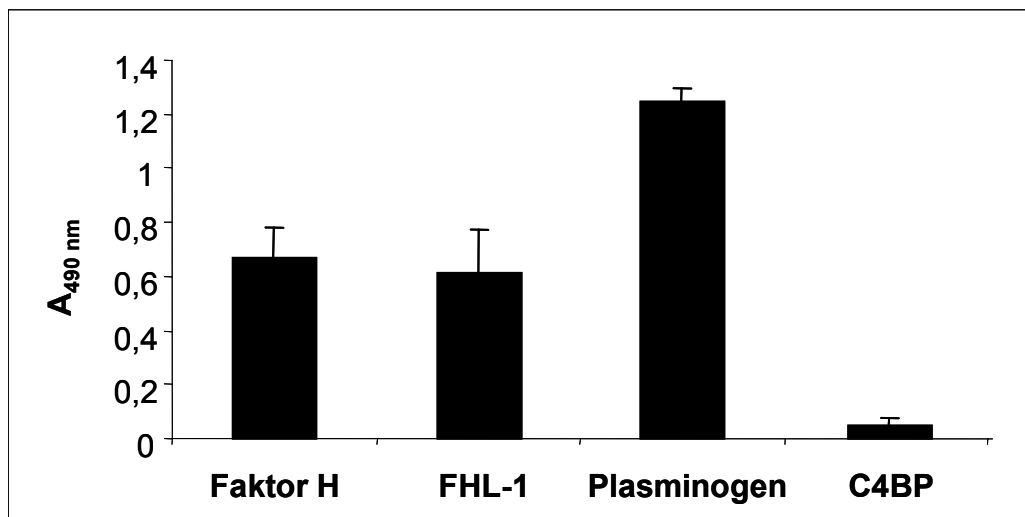


Abb. 8: Bindung von humanen Plasmaproteinen an rekombinantes CaGpm1p.

CaGpm1p wurde auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert und die Bindung von Faktor H, FHL-1, C4BP und Plasminogen wurde durch ELISA mit spezifischen Antiseren untersucht. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten +/- Standardabweichung.

3.3.1. Lokalisierung der Binderegionen in Faktor H und FHL-1

Um die Bindestellen für CaGpm1p innerhalb der beiden Wirtsregulatoren zu lokalisieren, wurden verschiedene Deletionskonstrukte von Faktor H und FHL-1 auf die Bindung an CaGpm1p getestet. Die Konstrukte, die die SCRs 1-5, SCRs 1-6, SCRs 1-7/FHL-1, SCRs 15-18, SCRs 19-20 repräsentieren, banden in unterschiedlicher Stärke an immobilisiertes CaGpm1p. Das Konstrukt SCR 19-20, welches den äußersten C-Terminus von Faktor H repräsentiert, interagierte stärker mit CaGpm1p als das weiter N-terminal abstammende Konstrukt SCR 15-18. Konstrukte, die SCRs 8-11 und SCRs 11-15 darstellten, haben nicht gebunden (Abb. 9A).

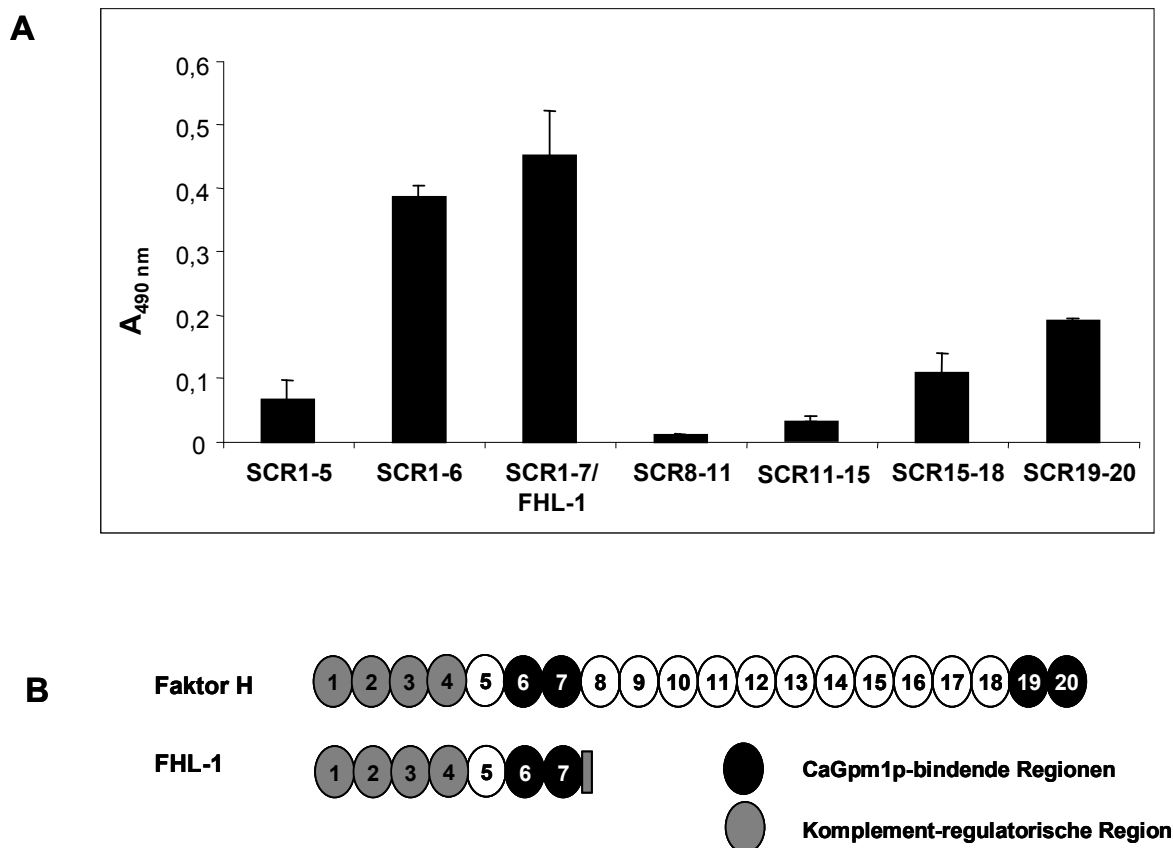


Abb. 9: Lokalisierung der Binderegionen in Faktor H und FHL-1.

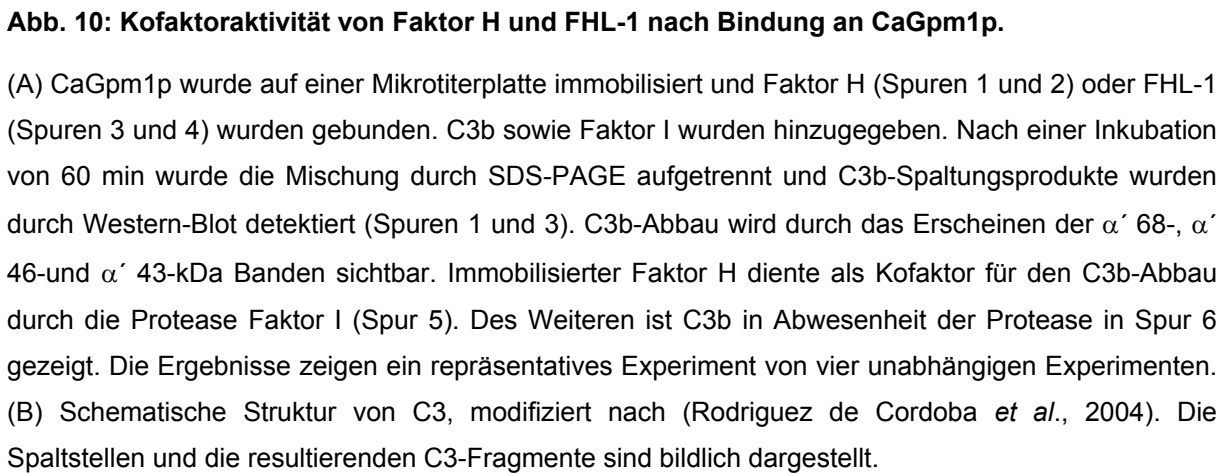
(A) CaGpm1p wurde auf der Oberfläche einer Mikrotiterplatte immobilisiert und die Bindung der angegebenen Faktor-H/FHL-1-Deletionskonstrukte wurde durch ELISA mit einem polyklonalem Faktor H-Antiserum untersucht. Ein repräsentatives Experiment von vier ist gezeigt und die Standardabweichung ist angegeben. (B) Struktur von Faktor H und FHL-1 mit den individuellen SCR-Domänen. Die CaGpm1p-Binderegionen sind schwarz markiert und die Komplement-regulatorische Domäne in den SCRs 1–4 ist grau gekennzeichnet.

Basierend auf diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass FHL-1 eine Interaktionsregion mit CaGpm1p hat, welche sich in SCR 6 und 7 befindet (Region I). Faktor H hat zwei Binderegionen, wobei eine mit FHL-1 geteilt wird und die zweite Region (Region II) im C-Terminus (SCRs 19 und 20) lokalisiert ist (Abb. 9B). In den ELISA-Assays bindet Region I mit stärkerer Intensität als Region II.

3.3.2. Komplement-regulatorische Aktivität von CaGpm1p-gebundenem Faktor H und FHL-1

Um zu beurteilen, ob Faktor H und FHL-1 in CaGpm1p-gebundener Form ihre Komplement-regulatorische Funktion behalten, wurde ihre Kofaktoraktivität für die Faktor I vermittelte Spaltung von C3b der an CaGpm1p gebundenen Regulatoren untersucht. Faktor H und FHL-1 wurden an immobilisiertes CaGpm1p gebunden und C3b wurde zusammen mit Faktor I hinzugefügt. Die Überstände wurden nach einer Inkubation von 60 min durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend wurden durch Western-Blot die C3b-Degradationsprodukte identifiziert (Abb. 10A).

C3b besteht aus einer α' - und einer β -Kette, die eine Mobilität von 114 bzw. 75 kDa besitzen. Bei der Faktor I-vermittelten C3b-Spaltung mit Faktor H bzw. FHL-1 als Kofaktor wird nur die α' -Kette an zwei distinkten Positionen gespalten (Abb. 10B). Daraus resultieren Spaltprodukte von α' 68, α' 46 und α' 43 kDa (Abb. 10A, Spur 1 und 3). Die gleichen Spaltprodukte wurden generiert, wenn Faktor H direkt immobilisiert und als Kofaktor für die C3b-Degradation verwendet wurde (Abb. 10A, Spur 5). Diese Ergebnisse zeigen, dass die an CaGpm1p gebundenen Komplementregulatoren ihre Funktion beibehalten und Kofaktoraktivität vermitteln.



3.3.3. Lysin-abhängige Bindung von Plasminogen an CaGpm1p

Die Art der Interaktion zwischen Plasminogen und Gpm1p wurde mit Hilfe des Lysinanalogs ϵ -Aminocapronsäure (ϵ ACA) detaillierter charakterisiert. ϵ ACA inhibierte die Bindung von Plasminogen an CaGpm1p abhängig von der eingesetzten Konzentration (Abb. 11). Eine Hemmung von ca. 20 % wurde bereits mit 0,1 mM ϵ ACA erzielt, wohingegen eine maximale Hemmung (> 90 %) mit 10 mM des Inhibitors erreicht wurde. Folglich ist die Bindung von Plasminogen an CaGpm1p durch Lysin-Reste vermittelt.

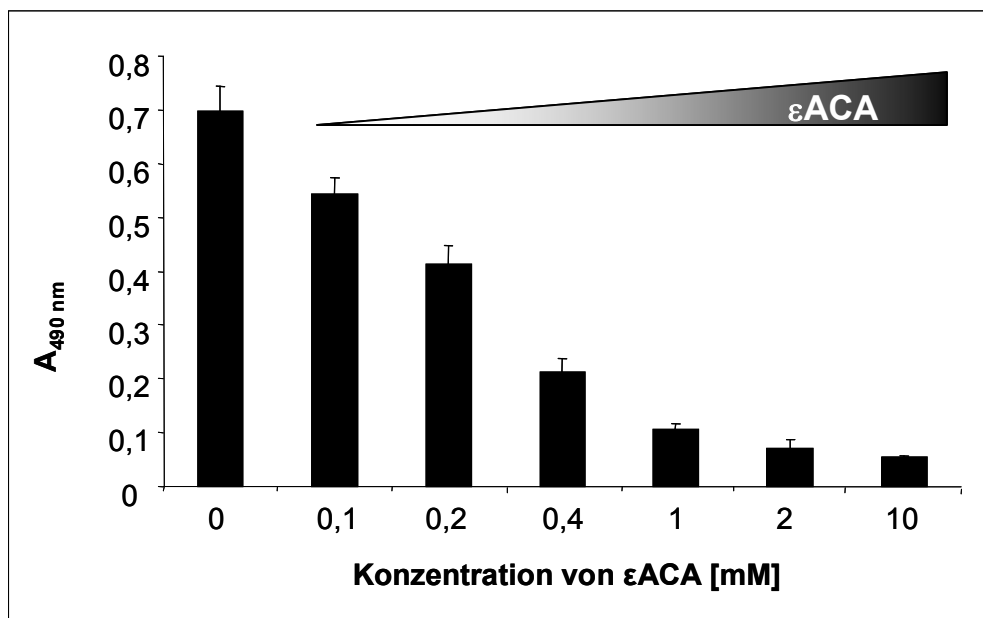


Abb. 11: Lysin-Reste vermitteln die Interaktion von CaGpm1p und Plasminogen.

ϵ ACA wurde für die Beeinflussung der Plasminogen-CaGpm1p Interaktion verwendet. CaGpm1p wurde auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert und mit Plasminogen in Gegenwart von ansteigenden ϵ ACA-Konzentrationen inkubiert. Dieses Experiment wurde dreimal wiederholt und ein repräsentatives Ergebnis ist mit +/- Standardabweichung gezeigt.

3.3.4. Aktivierung von CaGpm1p-gebundenem Plasminogen zu Plasmin

Um zu prüfen, ob Plasminogen gebunden an CaGpm1p zur funktionellen Protease Plasmin umgewandelt werden kann, wurde Plasminogen an immobilisiertes

CaGpm1p gebunden und mit dem Aktivator u-PA behandelt. Anschließend wurde die Spaltung des chromogenen Substrates S-2251 durch aktives Plasmin analysiert (Abb. 12A).

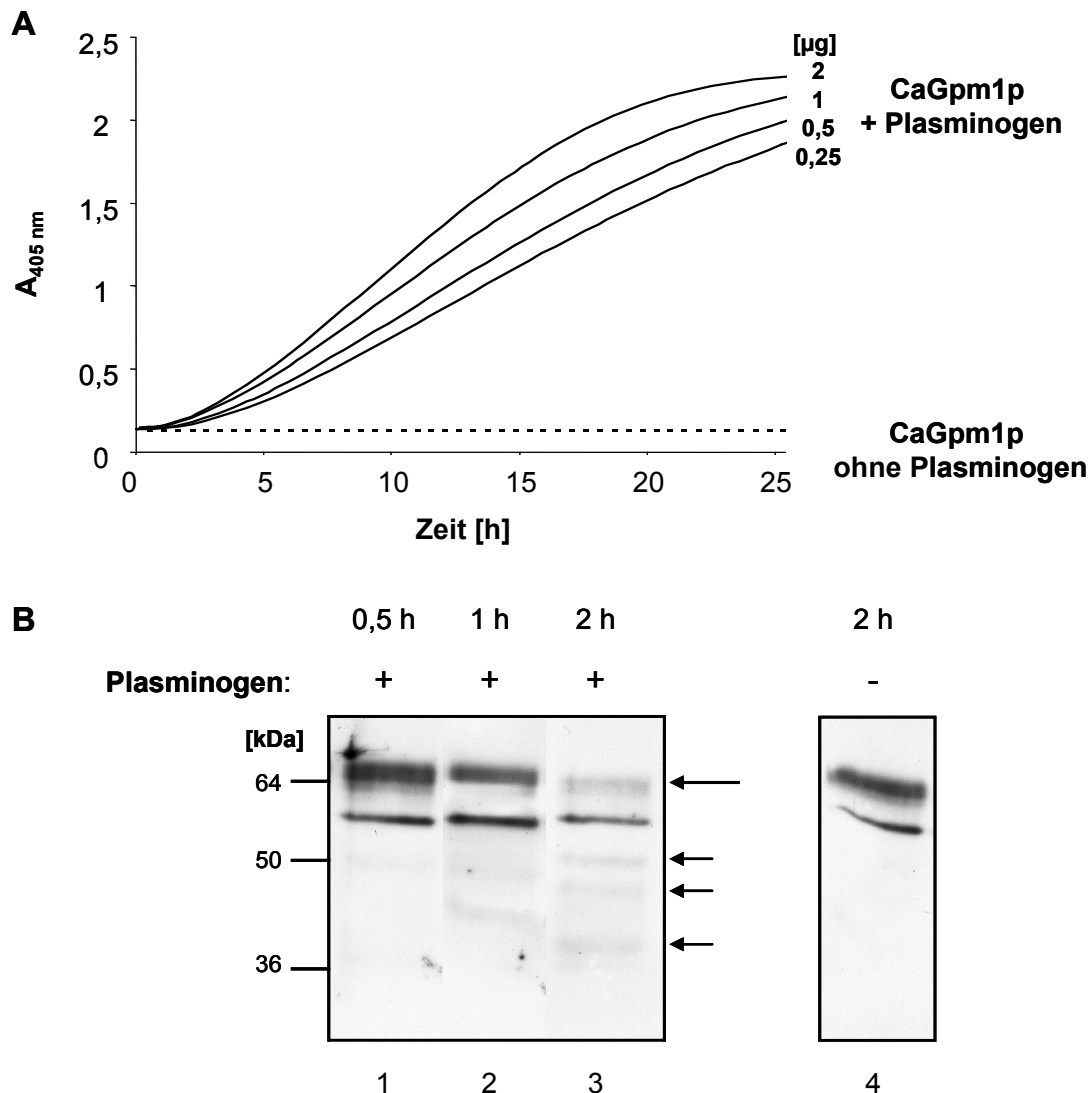


Abb. 12: CaGpm1p-gebundenes Plasminogen wird zu aktivem Plasmin umgewandelt.

CaGpm1p wurde auf die Oberfläche einer Mikrotiterplatte immobilisiert und Plasminogen wurde hinzu gegeben. Danach wurden der Aktivator u-PA und (A) das chromogene Substrat S-2251 oder (B) das natürliche Substrat Fibrinogen hinzu gegeben. Die proteolytische Umsetzung des Substrates wurde bei 405 nm gemessen (A). Fibrinogen und seine Spaltprodukte wurden durch Western-Blot nach verschiedenen Assay-Zeitpunkten detektiert (B). Die Ergebnisse zeigen ein repräsentatives Experiment von vier unabhängigen Experimenten.

Eine Umsetzung von S-2251 konnte in diesem Experiment beobachtet werden. Sie war abhängig von der immobilisierten CaGpm1p-Menge, von der Inkubation mit Plasminogen und von der Assaydauer. Da Plasmin das Schlüsselenzym der

Fibrinolyse ist, wurde auch die Degradation von Fibrinogen untersucht. Nach der Inkubation von CaGpm1p-gebundenem Plasmin mit Fibrinogen für verschiedene Zeitintervalle wurden die Überstände durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend wurden durch Western-Blot Fibrinogen-Degradationsprodukte identifiziert (Abb. 12B). Die fibrinolytische Plasmin-Aktivität war Zeit-abhängig und bezog sich vermutlich auf die A α -Kette von Fibrinogen. In Abwesenheit von Plasmin(ogen) bleibt Fibrinogen selbst stabil und wird nicht abgebaut. Folglich ist an CaGpm1p-gebundenes Plasminogen für den Aktivator u-PA zugänglich, das aktivierte Plasmin behält seine proteolytische Aktivität und trägt somit zur Fibrinolyse und Degradation von Komponenten der extrazellulären Matrix bei.

3.4. Gpm1p ist ein Oberflächenprotein von *C. albicans*

Um die Expression von CaGpm1p auf der Oberfläche von intakten *C. albicans*-Zellen zu bestätigen, wurde ein Antiserum gegen das rekombinante *C. albicans*-Protein im Kaninchen generiert. Dieses Antiserum detektierte spezifisch das rekombinante CaGpm1p im *P. pastoris*-Kulturüberstand (Abb. 13).

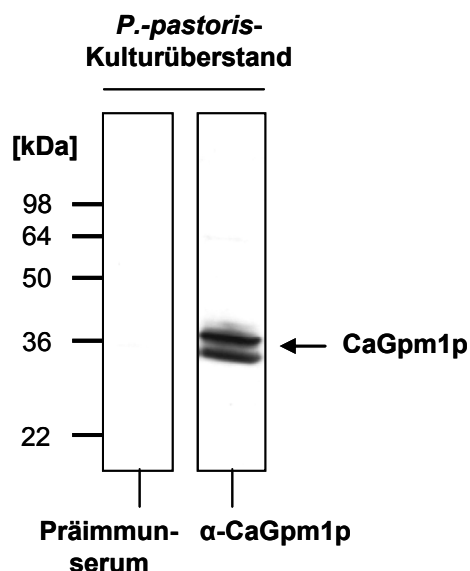


Abb. 13: Charakterisierung des generierten CaGpm1p-Antiserums.

Der Kulturüberstand des *P. pastoris*-CaGpm1p-Expressionsstammes wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend durch Western-Blot mit dem Präimmunserum und dem CaGpm1p-Antiserum untersucht.

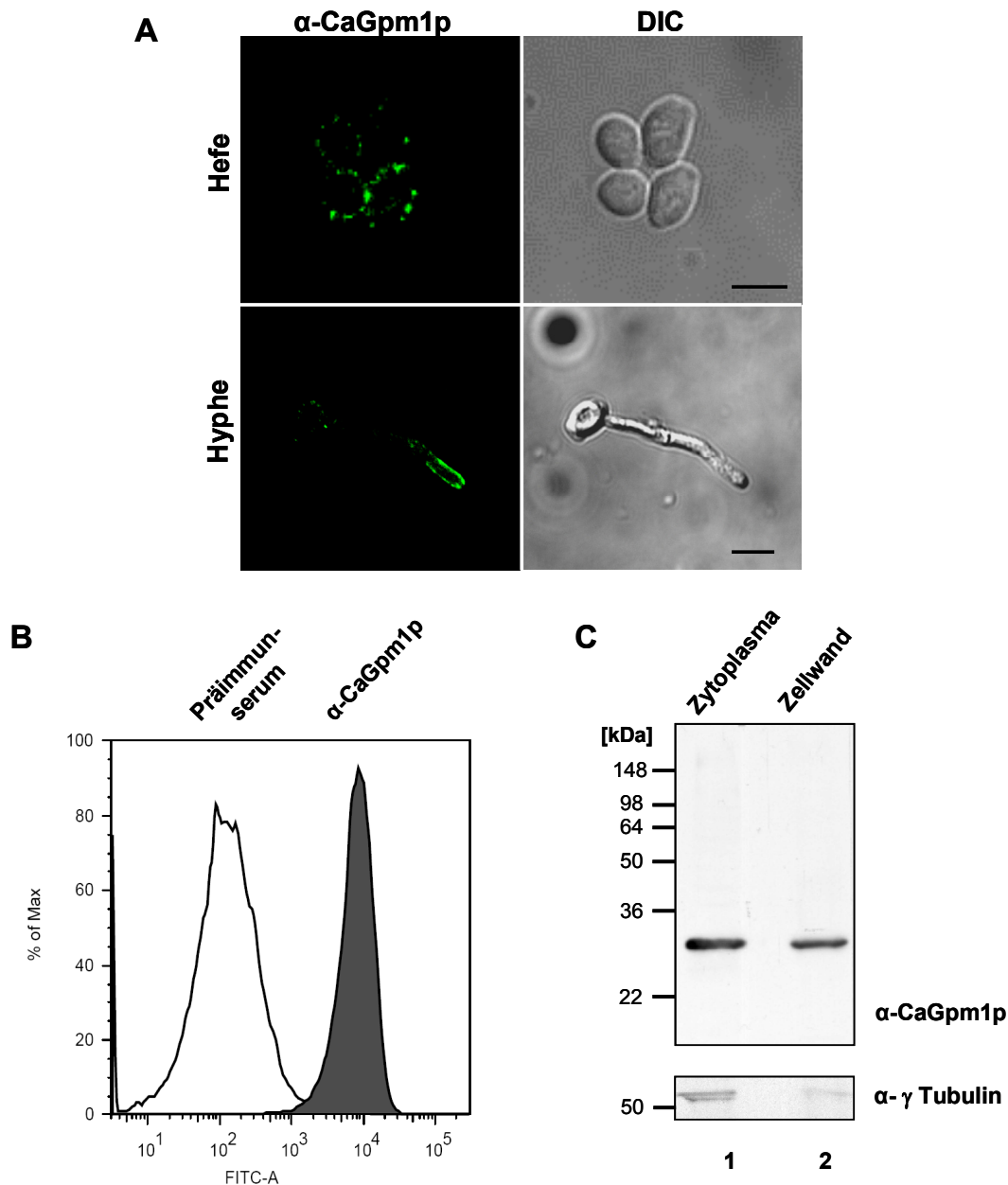


Abb. 14: Oberflächenlokalisierung von CaGpm1p.

(A) Oberflächenexpression von CaGpm1p wurde durch konfokale Laserscanning-Mikroskopie von intakten *C. albicans*-Hefezellen (oberes linkes Bild) oder Hyphen (unteres linkes Bild) identifiziert. DIC-Aufnahmen zeigen die Position der Zellen. Die Balken entsprechen 10 μ m. (B) Die *C. albicans*-Hefezellen wurden mit dem CaGpm1p-Antiserum oder dem Präimmunserum gefärbt, und die gebundenen Antikörper auf der Oberfläche der Zellen wurden mit einem FITC-markierten Antiserum detektiert. (C) Eine Zytoplasma- (Spur 1) und eine Zellwand-Proteinfraktion (Spur 2) von *C. albicans* wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western-Blot mit dem CaGpm1p-Antiserum analysiert. Das native CaGpm1p wurde als ein 27,5 kDa-Protein in beiden Proteinfraktionen identifiziert. Um eine zytoplasmatische Kontamination der Zellwand auszuschließen, wurden die Präparationen auf intrazelluläres γ -Tubulin untersucht (unteres Feld). Repräsentative Ergebnisse von vier unabhängigen Experimenten sind gezeigt.

Konfokale Laserscanning-Mikroskopie zeigte die Expression von CaGpm1p auf der Oberfläche von intakten *C. albicans*-Hefezellen (Abb. 14A). Die Immunfärbung war besonders markant an der Hyphenspitze. Des Weiteren wurde die Oberflächenlokalisierung von CaGpm1p mittels Durchflußzytometrie gezeigt (Abb. 14B). Darüber hinaus wurde durch Western-Blot mit dem spezifischen Antiserum das native 27,5 kDa CaGpm1p-Protein in der zytoplasmatischen Fraktion und auch im Zellwandextrakt nachgewiesen (Abb. 14C). Das Präimmunserum zeigte keine Reaktivität (Daten nicht gezeigt). Um die Kontamination der Zellwand-Fraktion mit intrazellulären Proteinen auszuschließen, wurde die Anwesenheit des intrazellulären Proteins γ -Tubulin untersucht. Das 53 kDa große γ -Tubulin wurde in der zytoplasmatischen aber nicht in der Zellwand-Fraktion nachgewiesen (Abb. 14C). Folglich wurde gezeigt, dass der Zellwandextrakt größtenteils frei von zytoplasmatischen Kontaminationen ist. Zusammenfassend konnte mit drei unabhängigen Methoden die Expression von CaGpm1p auf der Oberfläche von *C. albicans* gezeigt werden.

3.5. *In vivo*-Analyse der Funktionen von CaGpm1p

3.5.1. Herstellung einer *C. albicans gpm1*-Nullmutante

Um die Rolle von CaGpm1p in der Bindung von Faktor H, FHL-1 und Plasminogen an *C. albicans* zu untersuchen, wurde ein *Cagpm1*-Nullmutantenstamm mittels der Ura-Blaster-Methode hergestellt (Abb. 4). Als Ausgangsstamm für die Deletions-experimente von *CaGPM1* diente der Uridin-auxotrophe *C. albicans*-Stamm CAI-4. Aufgrund der Diploidie von *C. albicans* mussten zwei allelische Kopien von *CaGPM1* deletiert werden. Dazu wurde die in dieser Arbeit konstruierte *CaGPM1*-Disruptionskassette verwendet. Sie enthielt den *URA3*-Marker, flankiert von *hisG*-Sequenzen und den *CaGPM1*-Homologieregionen. Durch homologe Rekombination entstanden so der heterozygote Mutantenstamm CAP1 (*gpm1/GPM1*), der *Cagpm1*-Nullmutantenstamm CAP3 (*gpm1/gpm1*) sowie der komplementierte Stamm CAP5 (*gpm1/GPM1U*). Die korrekte Deletion von *CaGPM1* wurde durch zwei unterschiedliche Methoden bewiesen. Zunächst wurden die primären *C. albicans*-

Transformanten in einer analytischen PCR mit gen- und markerspezifischen Primern bezüglich der korrekten Integration der Disruptionskassette überprüft (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus wurden von den *CaGPM1*-Mutantenstämmen CAP1, CAP3 und CAP5 Zytoplasma- und Zellwand-Fractionen hergestellt. Diese Präparationen wurden durch Western-Blot auf CaGpm1p-Gehalt getestet. Während in dem *Cagpm1*-Nullmutantenstamm CAP3 CaGpm1p nicht mehr detektiert werden konnte, wurden in CAP1 und CAP5 geringfügig reduzierte CaGpm1p-Mengen nachgewiesen (Abb. 15). Demzufolge wurden beide Allele von *CaGPM1* vollständig deletiert.

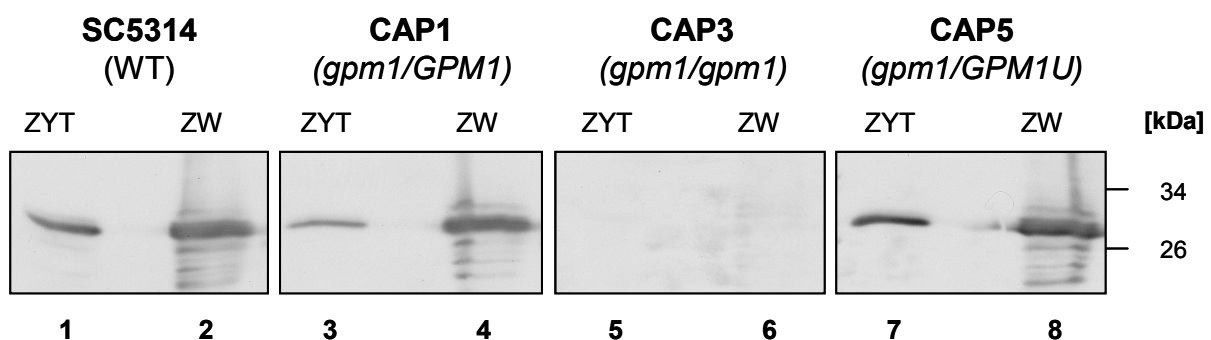


Abb. 15: Verifizierung der *CaGPM1*-Mutantenstämmen durch Western-Blot mit CaGpm1p-Antiserum.

Zytoplasma- (ZYT) und Zellwand- (ZW) Extrakte abgeleitet vom Wildtyp SC5314 (Spur 1 und 2), CAP1 (*gpm1/GPM1*) (Spur 3 und 4), CAP3 (*gpm1/gpm1*) (Spur 5 und 6) und CAP5 (*gpm1/GPM1U*) (Spur 7 und 8) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western-Blot mit dem CaGpm1p-spezifischen Antiserum analysiert. Ein repräsentatives Ergebnis von vier unabhängigen Experimenten ist gezeigt.

3.5.2. Wachstum der *Cagpm1*-Nullmutante CAP3 auf alternativen Kohlenstoffquellen

Um die Auswirkungen der *CaGPM1*-Deletion auf funktionaler Ebene zu überprüfen, wurde zunächst das Wachstum des *C. albicans*-Wildtyps SC5314 und der *GPM1*-Mutantenstämmen auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen untersucht. Die *C. albicans*-Stämme wurden auf festem Sabouraud-Minimalmedium angezogen, welches verschiedene Zucker, Ethanol, Acetat oder Glycerol als Kohlenstoffquelle enthielt (Tab. 8). Unter diesen Bedingungen wuchs CAP3 nicht, wenn verschiedene Zucker wie Glukose, Galaktose, Saccharose, Raffinose sowie Ethanol oder Acetat

die einzige Kohlenstoffquelle waren. Nur in Anwesenheit von Glycerol als Kohlenstoffquelle konnte ein Wachstum der *Cagpm1*-Nullmutante CAP3 beobachtet werden. Die Kombination von Glycerol und Ethanol als Kohlenstoffquelle veränderte nicht das Wachstumsverhalten von CAP3, jedoch war die Koloniemorphologie verändert. Die Kolonien erschienen nicht mehr glatt, weiß und glänzend, sondern waren rau und gelblich. Der Wildtyp SC5314, CAP1 und CAP5 konnten auf allen Kohlenstoffquellen wachsen. Das Vorhandensein von Zuckern in Medien mit Glycerol als Kohlenstoffquelle inhibierte das Wachstum von CAP3 (Tab. 8).

Tab. 8: Wachstumsphänotypen der *CaGPM1*-Mutantenstämme auf Festmedien.

Das Wachstum von SC5314 (WT), CAP1 (*gpm1/GPM1*), CAP3 (*gpm1/gpm1*) bzw. CAP5 (*gpm1/GPM1U*) wurde auf Sab- und YP-Festmedium mit verschiedenen Kohlenstoffquellen (D Glukose, Gal Galactose, Mal Maltose, Sac Saccharose, Raf Raffinose, E Ethanol, Acetat, G Glycerol) nach 3 Tagen Inkubation bei 30°C untersucht. (– kennzeichnet kein Wachstum, + schwaches Wachstum, ++ gutes Wachstum, +++ sehr gutes Wachstum.)

| <i>C. albicans</i>- Stamm | Sab D | Sab Gal | Sab Mal | Sab Sac | Sab Raf | Sab E | Sab Acetat | Sab G | Sab E G | Sab Acetat G | Sab Zucker G | YP D | YP G | YP E G |
|--------------------------------------|----------|------------|------------|------------|------------|----------|---------------|----------|---------------|--------------------|--------------------|---------|---------|--------------|
| SC5314 | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ | +++ | +++ |
| CAP1 | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ | +++ | +++ |
| CAP3 | - | - | - | - | - | - | - | ++ | ++ | + | - | - | +++ | +++ |
| CAP5 | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ | +++ | +++ |

Für Glukose wurde diese Wachstumshemmung genauer untersucht. Die Standard-Glukosekonzentration von 2 % hemmte das Wachstum von CAP3 in Glycerol-haltigem Medium; 0,05 % Glukose wirkte ebenfalls noch wachstumshemmend. Erst eine Glukosekonzentration von 0,005 % war für CAP3 tolerierbar (Abb. 16).

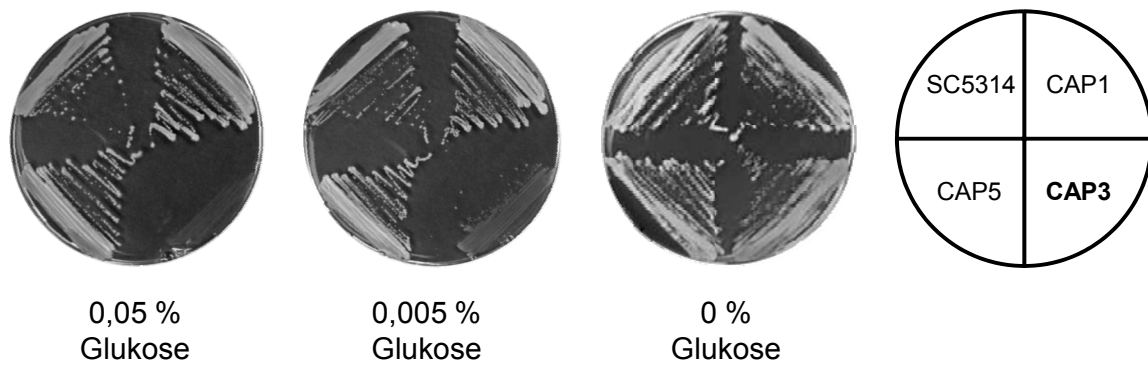


Abb. 16: Hemmung des Wachstums der *Cagpm1*-Nullmutante CAP3 auf Glycerol-Medium in Anwesenheit von Glukose.

Das Wachstum von SC5314 (WT), CAP1 (*gpm1/GPM1*), CAP3 (*gpm1/gpm1*) und CAP5 (*gpm1/GPM1U*) wurde nach 3 Tagen Inkubation bei 30°C untersucht. Glukose hemmte Dosisabhängig das Wachstum von CAP3 auf SabDG-Festmedium. Die Ergebnisse zeigen ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten.

Darüber hinaus wurde das Wachstum der *C. albicans*-Stämme auch in Flüssigmedien untersucht. Die Wachstumskurven und die Generationszeiten der vier *C. albicans*-Stämme in SabG-Minimalmedium (Abb. 17A, D) waren fast identisch und wichen nur gering voneinander ab.

Das gleiche Ergebnis war im YPG- und YPGE-Vollmedium zu verzeichnen (Abb. 17B, C, D), wenn Glycerol allein oder Glycerol in Kombination mit Ethanol als Kohlenstoffquelle zur Verfügung standen, wobei aber die Generationszeiten kürzer waren. Diese Ergebnisse treffen auch auf die Festmedien zu (Tab. 8). Auch im YPD-Vollmedium, welches Glukose enthielt, konnten die *C. albicans*-Stämme SC5314, CAP1 sowie CAP5 gut wachsen, jedoch war das Wachstum der *Cagpm1*-Nullmutante CAP3 inhibiert (Tab. 8, Wachstumskurve nicht gezeigt).

Folglich bewirkt die vollständige Deletion von *CaGPM1* einen Wachstumsdefekt auf glykolytischen und gluconeogenischen Substraten in Minimal- und Vollmedien. Nur bei Vorliegen von alternativen Kohlenstoffquellen war die *Cagpm1*-Nullmutante CAP3 in der Lage zu wachsen.

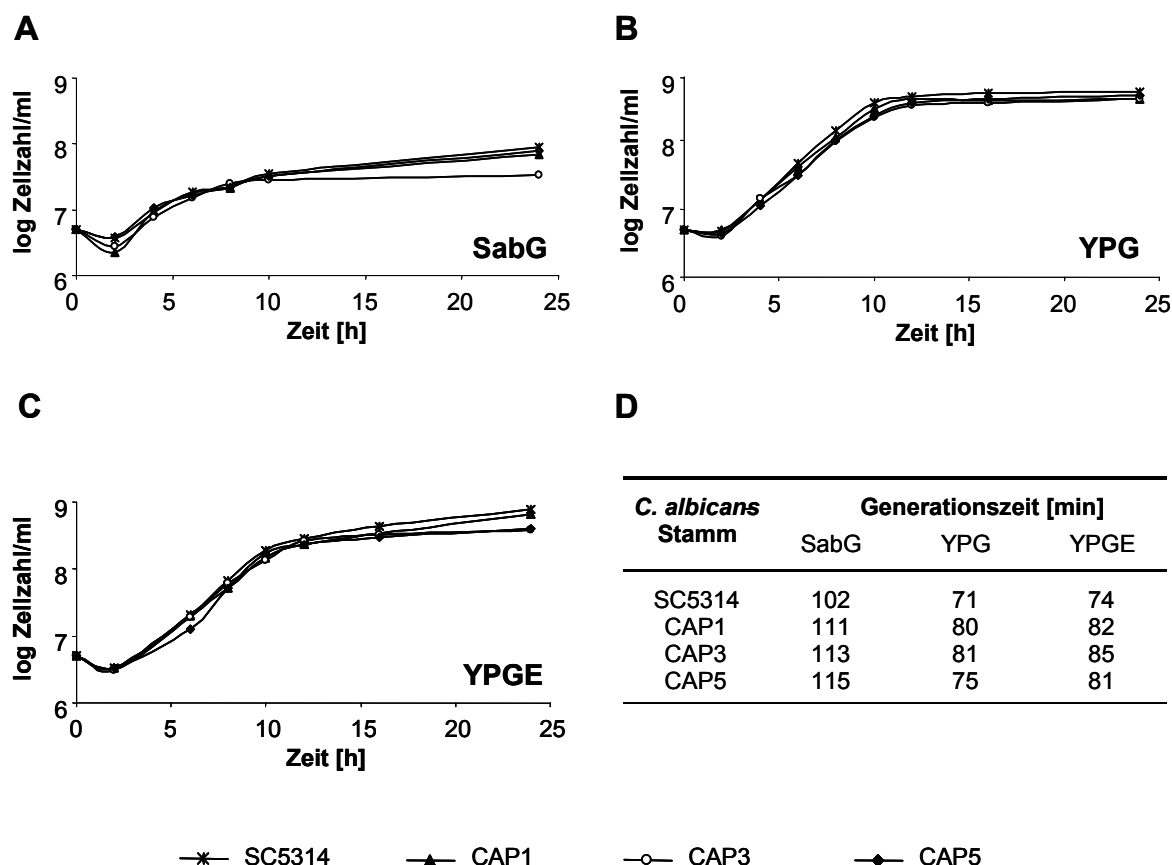


Abb. 17: Wachstumsanalyse der *C. albicans*-Stämme in Flüssigmedien.

(A) SabG-Medium, (B) YPG-Medium und (C) YPGE-Medium wurden mit SC5314 (WT), CAP1 (*gpm1/GPM1*), CAP3 (*gpm1/gpm1*) bzw. CAP5 (*gpm1/GPM1U*) beimpft und das Wachstum wurde bei 30°C über 24 h verfolgt. (D) Generationszeiten der *C. albicans*-Stämme.

3.5.3. Bindung von Faktor H und Plasminogen aus humanem Serum an die *Cagpm1*-Nullmutante CAP3

Um zu zeigen, dass Gpm1p von *C. albicans* neben seiner intrazellulären Funktion als Enzym in der Glykolyse bzw. Gluconeogenese extrazellulär als Faktor H-, FHL-1- und Plasminogen-bindendes Protein relevant ist, wurden die *CaGPM1*-Mutantenstämme auf die Bindung von Faktor H und Plasminogen aus humanem Serum im *Candida*-ELISA getestet. Die Bindung beider Plasmaproteine war im *Cagpm1*-Nullmutantenstamm CAP3 im Vergleich zum *C. albicans*-Wildtyp SC5314 nicht signifikant reduziert (Abb. 18).

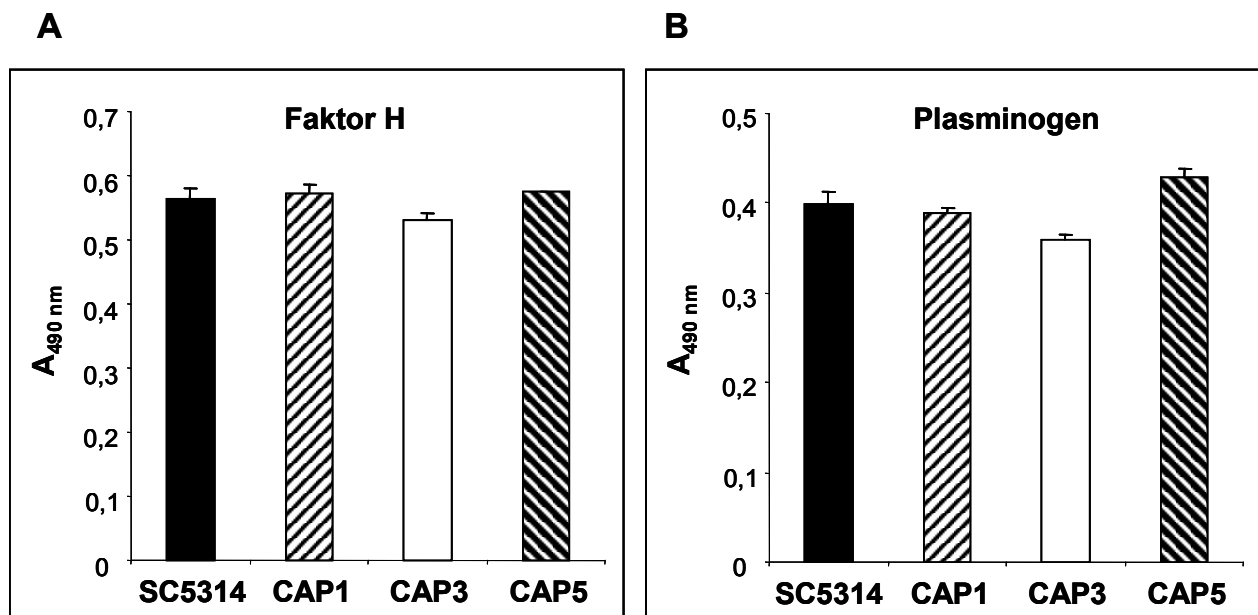


Abb. 18: Bindung von Faktor H und Plasminogen an die *C. albicans*-Stämme.

C. albicans SC5314 (WT), CAP1 (*gpm1/GPM1*), CAP3 (*gpm1/gpm1*) bzw. CAP5 (*gpm1/GPM1U*) wurden auf die Oberfläche einer Mikrotiterplatte immobilisiert und mit NHS inkubiert. Nach dem Waschen wurde gebundener Faktor H (A) oder Plasminogen (B) mit spezifischem Antiserum identifiziert. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten und die Standardabweichung ist angegeben.

Die nur geringfügige Reduktion der Bindung von Faktor H um ~6 % (Abb. 18A) und von Plasminogen um ~10 % (Abb. 18B) und nicht der komplette Verlust der Bindung an CAP3 lässt sich durch das Vorhandensein von zusätzlichen Faktor-H- und Plasminogen-bindenden Oberflächenproteinen erklären.

3.5.4. Avirulenz der *Ca**gpm1*-Nullmutante CAP3 im embryonierten Hühnerei-Modell

Die Virulenz der *CaGPM1*-Mutantenstämme CAP1, CAP3 und CAP5 wurde im embryonierten Hühnerei getestet (Abb. 19). CAP3 war in diesem Tiermodell avirulent, da 70 % der mit der *Ca**gpm1*-Nullmutante CAP3 beimpften Hühnerembryonen bis zum 8. Tag überlebten. Zum Schein behandelte Kontrollembryonen wiesen ebenfalls eine Letalität von 10 % auf. Hingegen waren CAP1 und CAP5 virulent. Sie zeigten annähernd die gleiche Virulenz wie der Wildtyp

SC5314. Nach der Applikation von SC5314 auf die Chorionallantoismembran (CAM) des Hühnerembryos waren bereits nach dem ersten Tag alle Embryonen abgestorben, bei der Infektion mit CAP1 und CAP5 lebten zu diesem Zeitpunkt noch 40 % bzw. 30 % der Embryonen. Am 4. Tag nach der Infektion mit CAP1 bzw. CAP5 waren auch hier alle Embryonen tot. Demzufolge ist CaGpm1p für die Virulenz von *C. albicans* notwendig.

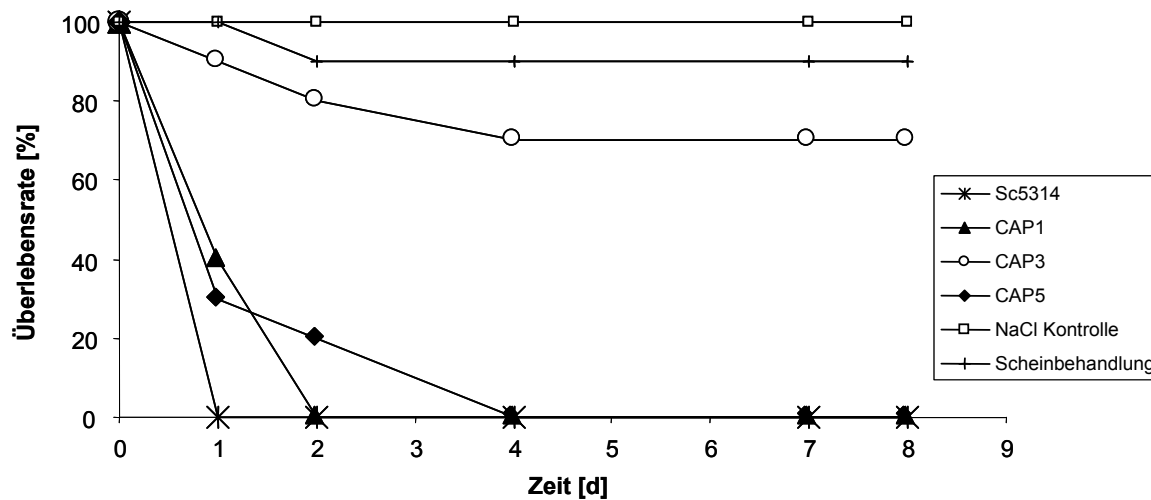


Abb. 19: CaGpm1p ist für die vollständige Virulenz von *C. albicans* erforderlich.

Die Pathogenität von *C. albicans* SC5314 (Stern, WT), CAP1 (Dreieck, *gpm1/GPM1*), CAP3 (Kreis, *gpm1/gpm1*) und CAP5 (Karo, *gpm1/GPM1U*) wurde im embryonierten Hühnerei-Modell untersucht. Das Überleben der Embryos wurde über 8 Tage verfolgt. NaCl (Quadrat) wurde als Negativkontrolle eingesetzt, darüber hinaus wurde eine Scheinbehandlung der Eier durchgeführt.

4. Diskussion

Während der Evolution haben sich eine Vielzahl von Interaktionen zwischen Pathogenen und ihren Wirten entwickelt. Humanpathogene Erreger haben im Laufe ihrer Evolution die Fähigkeit erworben, in den humanen Wirt einzudringen, den Angriffen des Immunsystems zu widerstehen und sich im Wirt zu vermehren. Im Fokus dieser Arbeit steht die Immunevasion von *C. albicans* durch die Ausnutzung von humanen Plasmaproteinen.

In dieser Arbeit wurde das erste fungale Protein identifiziert, dass die Wirtsimmunregulatoren Faktor H und FHL-1 bindet. Durch das Screening eines Proteinarrays von *S. cerevisiae* wurde die Phosphoglycerat-Mutase (ScGpm1p) als ein Faktor H- und FHL-1-bindendes Protein identifiziert. Das homologe Gpm1p von *C. albicans* (CaGpm1p) wurde kloniert und rekombinant exprimiert. Das aufgereinigte CaGpm1p band spezifisch Faktor H und FHL-1, aber nicht C4BP. Die Binderegionen für CaGpm1p wurden innerhalb der beiden Wirtsproteine identifiziert. FHL-1 band an CaGpm1p durch die SCRs 6 und 7, und Faktor H verwendete zwei Binderegionen, die in den SCRs 6 und 7 sowie in den SCRs 19 und 20 lokalisiert sind. Darüber hinaus interagierte das rekombinante CaGpm1p über seine Lysin-Reste mit humanem Plasminogen. CaGpm1p ist ein Oberflächenprotein, das in der Zellwand-Fraktion durch Western-Blot und durch Immunfärbung von intakten *C. albicans*-Hefezellen und -Hyphen mit einem spezifischen Antiserum nachgewiesen wurde. Jedes der drei humanen Plasmaproteine (Faktor H, FHL-1, Plasminogen) war in CaGpm1p-gebundener Form funktionell aktiv. Faktor H und FHL-1 zeigten Kofaktoraktivität für die Faktor I-vermittelte Spaltung von C3b und gebundenes Plasminogen wurde durch u-PA zu fibrinolytisch aktivem Plasmin umgewandelt. *C. albicans* akquiriert Faktor H, FHL-1 und Plasminogen aus humanem Plasma und in dieser Arbeit wird gezeigt, dass CaGpm1p daran beteiligt ist. Die Bedeckung der *C. albicans*-Oberfläche mit diesen humanen Proteinen ermöglicht dem Pathogen die Immunevasion und fördert die Gewebsinvasion.

Die *in vivo*-Funktion von CaGpm1p wurde durch die in dieser Arbeit erzeugte *Cagpm1*-Nullmutante CAP3 (*gpm1/gpm1*) überprüft. Die Bindung von Faktor H und Plasminogen an CAP3 war nur geringfügig reduziert. Demnach besitzt *C. albicans* ein redundantes System zur Bindung der humanen Regulatoren. Darüber hinaus

zeigte CAP3 einen Wachstumsdefekt auf glykolytischen und gluconeogenischen Substraten und war avirulent im embryonierten Hühnerei-Modell. Folglich besitzt CaGpm1p intrazellulär enzymatische Funktionen in der Glykolyse und Gluconeogenese. Dies ermöglicht die flexible metabolische Anpassung von *C. albicans* an verschiedene Wirtsnischen und trägt somit zur Virulenz bei.

4.1. Gpm1p - ein neues Oberflächenprotein von *C. albicans*

Die Phosphoglycerat-Mutase Gpm1p wurde ursprünglich als ein zytoplasmatisches glykolytisches Protein identifiziert, welches während der Glykolyse die katalytische Umwandlung von 3-Phosphoglycerat (3PG) zu 2-Phosphoglycerat (2PG) und die umgekehrte Reaktion in der Gluconeogenese katalysiert (Abb. 20, (Rodicio & Heinisch, 1987)).

Die Phosphoglycerat-Mutase von *C. albicans* hat eine berechnete molekulare Masse von 27,5 kDa und besitzt keine offensichtlichen Signal- und Transportsequenzen. CaGpm1p ist im Zytoplasma und auf der Zelloberfläche als Teil der Zellwand lokalisiert, wie in dieser Arbeit durch Immunofluoreszenz, Western-Blot und Durchflußzytometrie demonstriert wurde (Abb. 14). Mit Hilfe des spezifischen und neu hergestellten polyklonalen Antiserums wurde die Oberflächenlokalisierung von Gpm1p auf *C. albicans*-Hefezellen und Hyphen gezeigt. In Hyphen wurde CaGpm1p vor allem an der Hyphenspitze nachgewiesen (Abb. 14A). Dort befindet sich auch der Bereich des stärksten Wachstums (Wessels, 1993). Bei einer ins Wirtsgewebe einwachsenden Hyphe muss die Hyphenspitze auch die Auflösung extrazellulärer Matrix bewerkstelligen. Daneben wird sie wahrscheinlich besonders stark von Proteinen der Immunabwehr attackiert. Die Oberflächenlokalisierung und Zugänglichkeit von CaGpm1p wird durch das Vorhandensein von CaGpm1p-Antikörpern in Seren von Patienten mit systemischer Kandidosis (Pardo *et al.*, 2000b) und in Mäusen nach der Infektion mit *C. albicans* (Fernandez-Arenas *et al.*, 2004) weiter bestätigt. Auch das Gpm1p von *S. cerevisiae* ist im Zytoplasma und in der Zellwand verteilt (Motshwene *et al.*, 2003).

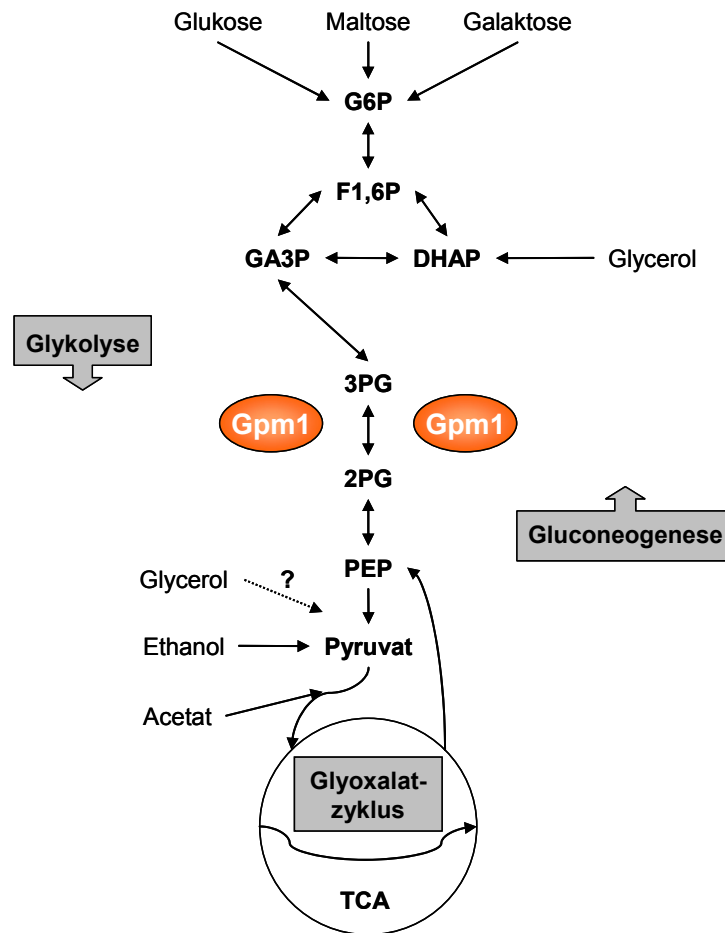


Abb. 20: Rolle von Gpm1p beim Kohlenstoffwechsel.

Die zentralen Kohlenstoffwechselwege (fett gedruckt) Glykolyse, Gluconeogenese und Glyoxalatzyklus sind mit ihren Substraten gezeigt. Inmitten des glykolytischen Stamms katalysiert Gpm1p (orange markiert) die reversible Umwandlung von 3- Phosphoglycerat (3PG) und 2- Phosphoglycerat (2PG).

In dieser Arbeit konnte auch natives CaGpm1p im Medium nach Kultivierung von *C. albicans* nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Natives Gpm1p wird ebenfalls in einer enzymatisch aktiven Form von regenerierenden *S. cerevisiae*-Protoplasten abgegeben (Motshwene *et al.*, 2003, Pardo *et al.*, 2000a). Wie das Protein an die Zelloberfläche gelangt, ist noch unklar. Ein möglicher Exportmechanismus von CaGpm1p wäre durch sekretorische Vesikel oder Endosomen möglich, wenn CaGpm1p Affinität zu diesen Vesikeln besitzt. Oder CaGpm1p durchquert die Membran durch passiven Transfer oder durch Umklappen der Membran („membrane flipping“) (Nombela *et al.*, 2006). Des Weiteren gelangt CaGpm1p wahrscheinlich auch passiv durch abgestorbene *C. albicans*-Zellen nach außen und bindet dann an noch lebende Zellen. Es gibt Hinweise, dass *CaGPM1*

durch den Transkriptionsfaktor Efg1p reguliert wird (Doedt *et al.*, 2004, Setiadi *et al.*, 2006). Efg1p ist ein zentraler Regulator von *C. albicans*, der die Morphogenese und den Metabolismus koordiniert. Für das „moonlighting protein“ Tsa1p von *C. albicans* wurde bereits ein Efg1p-abhängiger Export nachgewiesen (Urban *et al.*, 2005).

In einem proteomischen Ansatz wurde CaGpm1p schon als ein Bestandteil der Zellwand identifiziert, der durch nichtkovalente Bindungen und durch Disulfidbrücken an die Zelloberfläche assoziiert ist (Pitarch *et al.*, 2002) und welcher Plasminogen bindet (Crowe *et al.*, 2003). Wurde *C. albicans* mit rekombinantem CaGpm1p inkubiert und dann gewaschen, konnte nach Elution mit Kaliumthiocyanat das rekombinante CaGpm1p durch Western-Blot in der Eluat-Fraktion nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Diese Reassoziierung von sekretierten Proteinen ohne typischen Membrananker ist ein allgemeines Phänomen bei extrazellulären „housekeeping enzymes“ (Pancholi & Chhatwal, 2003).

4.2. CaGpm1p - ein multifunktionelles Protein

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CaGpm1p extrazellulär als Rezeptor für Faktor H, FHL-1 und Plasminogen fungiert, wohingegen CaGpm1p intrazellulär als Enzym der Glykolyse und Gluconeogenese aktiv ist. In den letzten Jahren wurde eine wachsende Anzahl von Proteinen bekannt, die mehr als eine Funktion in einem Organismus besitzen (Pancholi & Fischetti, 1992, Gozalbo *et al.*, 1998, Bergmann *et al.*, 2001, Dallo *et al.*, 2002, Bergmann *et al.*, 2004, Urban *et al.*, 2005). Aufgrund der Identifizierung von zusätzlichen Funktionen, die sich von der ursprünglich bekannten Funktion unterscheiden, werden diese Proteine auch „moonlighting proteins“ („Schwarzarbeiter“) genannt (Jeffery, 2003). Die verschiedenen Funktionen der Proteine können entweder durch unterschiedliche Lokalisierung innerhalb bzw. außerhalb der Zelle, unterschiedliche Oligomerisierung, mehrere Substratbindestellen oder Komplexbildung mit anderen Proteinen definiert werden.

4.2.1. Funktion des extrazellulären CaGpm1p

Extrazellulär fungiert CaGpm1p als Rezeptor für Faktor H, FHL-1 und Plasminogen, da CaGpm1p diese Wirtproteine spezifisch bindet (Abb. 8, 9, 11). In CaGpm1p-gebundener Form war jeder der humanen Regulatoren funktionell aktiv (Abb. 10 und 12). *C. albicans*-Hefezellen und -Hyphen erwerben also durch extrazelluläres CaGpm1p humane Regulatoren des Komplement- und des fibrinolytischen Systems und nutzen deren Funktion in der Kontrolle der Homöostase und Gewebsintegrität für ihre Tarnung und die Gewebeinvasion während des Infektionsprozesses.

FHL-1 verfügt über eine und Faktor H besitzt zwei Kontaktregionen für CaGpm1p, die auf SCRs 6 und 7 und SCRs 19 und 20 (Abb. 9) eingegrenzt wurden. Die selben Kontaktregionen innerhalb der Komplementregulatoren werden auch von lebenden *C. albicans*-Zellen genutzt (Meri *et al.*, 2002a). Die Bindung der humanen Immunregulatoren durch SCRs 6 und 7 und SCRs 19 und 20 ist ein allgemeines Merkmal für die Anheftung der Regulatoren an pathogene Erreger. Die gleichen Binderegionen werden sowohl vom M-Protein der Gruppe-A-Streptokokken, von BbCRASP-1 und BbCRASP-2 von *B. burgdorferi* (Kraiczy & Würzner, 2006) und auch von Tuf von *P. aeruginosa* (Kunert *et al.*, 2007) verwendet. Die Bindung über den C-Terminus, d.h. über SCRs 6 und 7 (FHL-1) bzw. über SCRs 19 und 20 (Faktor H), orientiert beide Wirtsproteine mit den N-terminalen komplementregulatorischen Domänen in die Umgebung des Pathogens und ermöglicht dadurch die inhibitorische Aktivität. Infolgedessen kann Faktor I mit Faktor H als Kofaktor C3b zu iC3b spalten, und die Komplementkaskade auf der *C. albicans*-Oberfläche wird inaktiviert (Abb. 21). Die nachfolgenden C3b-abhängigen Prozesse wie der Aufbau der C3-Konvertase, die Phagozytose und die Bildung der C5-Konvertase und somit die Generierung des stärksten Anaphylatoxins C5a werden gehemmt. Dieser Mechanismus ist vor allem zu einem frühen Zeitpunkt der *C. albicans*-Infektion bedeutsam. Die Bekämpfung von *C. albicans* durch humane Immunzellen wird so verzögert und *C. albicans* kann sich vermehren und weiter disseminieren.

CaGpm1p bindet auch humanes Plasminogen, den Vorläufer der Serin-Protease Plasmin, wie es *in vitro* durch ELISA gezeigt wurde (Abb. 8). Die dosisabhängige

Hemmung mit dem Lysin-Analog ϵ ACA deutet darauf hin, dass Lysin-Reste für die Interaktion von Plasminogen und CaGpm1p von Bedeutung sind (Abb. 11). Es wurden bereits mehrere Plasminogen-bindende Oberflächenproteine von *C. albicans* identifiziert, die alle auf unkonventionellen Wegen sekretiert werden, wie z. B. die Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, die Alkohol-Dehydrogenase, die Katalase und die Thioredoxin-Peroxidase (Nombela *et al.*, 2006). An CaGpm1p gebundenes Plasminogen ist für die Aktivierung durch u-PA zugänglich und wird zu der aktiven Serin-Protease Plasmin umgewandelt. In dieser gebundenen Form spaltet Plasmin sowohl das chromogene Substrat S-2251 als auch das natürliche Substrat Fibrinogen (Abb. 12). Die lösliche Vorstufe des Fibrins, das Fibrinogen, wird durch Plasmin in Fibrinogenspaltprodukte zerteilt. Die Fibrin(ogen)-Spaltprodukte hemmen dann ihrerseits die Fibrinvernetzung (Cesarman-Maus & Hajjar, 2005).

C. albicans besitzt kein eigenes Plasminogen-Aktivator-System (Crowe *et al.*, 2003) und muss also Wirtsfaktoren für die Aktivierung des gebundenen Plasminogens ausnutzen. Auch *B. burgdorferi* bindet Plasminogen und kann es nicht selbst aktivieren (Klempner *et al.*, 1995). Trotzdem hat die Plasminogen-Bindung große Bedeutung für das invasive Wachstum der Borrelien (Coleman *et al.*, 1997). Da Endothelzellen den Plasminogenaktivator t-PA sekretieren, führt der direkte Kontakt mit diesen Wirtszellen zur Aktivierung des Plasminogens, das an die Mikrobenoberfläche gebunden ist (Lähteenmäki *et al.*, 2001). Der humane Plasminogenaktivator u-PA bindet über Rezeptoren an Zelloberflächen, so auch über einen noch unbekannten u-PA-Rezeptor an *C. albicans* (Daten nicht gezeigt). *C. albicans* verfügt nach Serumkontakt also über eine oberflächengebundene Wirtsprotease, die extrazelluläre Matrix abbauen kann (Abb. 21). Daneben produziert *C. albicans* sekretierte Aspartyl-Proteasen (SAPs), die auch verschiedene humane Substrate degradieren (Naglik *et al.*, 2003). Dieses Enzymarsenal trägt möglicherweise zu einer effektiven Dissemination des Pathogens bei.

Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass Plasmin(ogen) auch für die Immunevasion von Pathogenen von Bedeutung ist. *S. aureus* bindet ebenfalls Plasminogen mit Hilfe diverser Plasminogen-Rezeptoren an seine Oberfläche (Molkanen *et al.*, 2002). Durch die Exkretion der Staphylokinase wird das an die *S. aureus*-Oberfläche gebundene Plasminogen zur aktiven Protease Plasmin umgewandelt, die IgG und C3b von der Bakterienwand spalten kann (Rooijackers *et al.*, 2005). Dieser Prozess vermindert die Phagozytose des Pathogens durch humane Neutrophile. Aktuelle

Daten belegen, dass die SAPs von *C. albicans* durch den Abbau von Komplementproteinen (C3b, C4b, C5) ebenfalls zur Komplementevasion von *C. albicans* beitragen (Katharina Gropp, persönliche Kommunikation). In der Vergangenheit konnte bereits die Spaltung von IgA und IgG (Ruchel, 1986) sowie C3 (Kaminishi *et al.*, 1995) durch sekretierte extrazelluläre Proteasen von *C. albicans* gezeigt werden. Sekretierte Proteasen sind auch im Zusammenhang mit der Komplementevasion des humanpathogenen und opportunistischen Pilzes *A. fumigatus* untersucht worden (Judith Behnsen, persönliche Kommunikation).

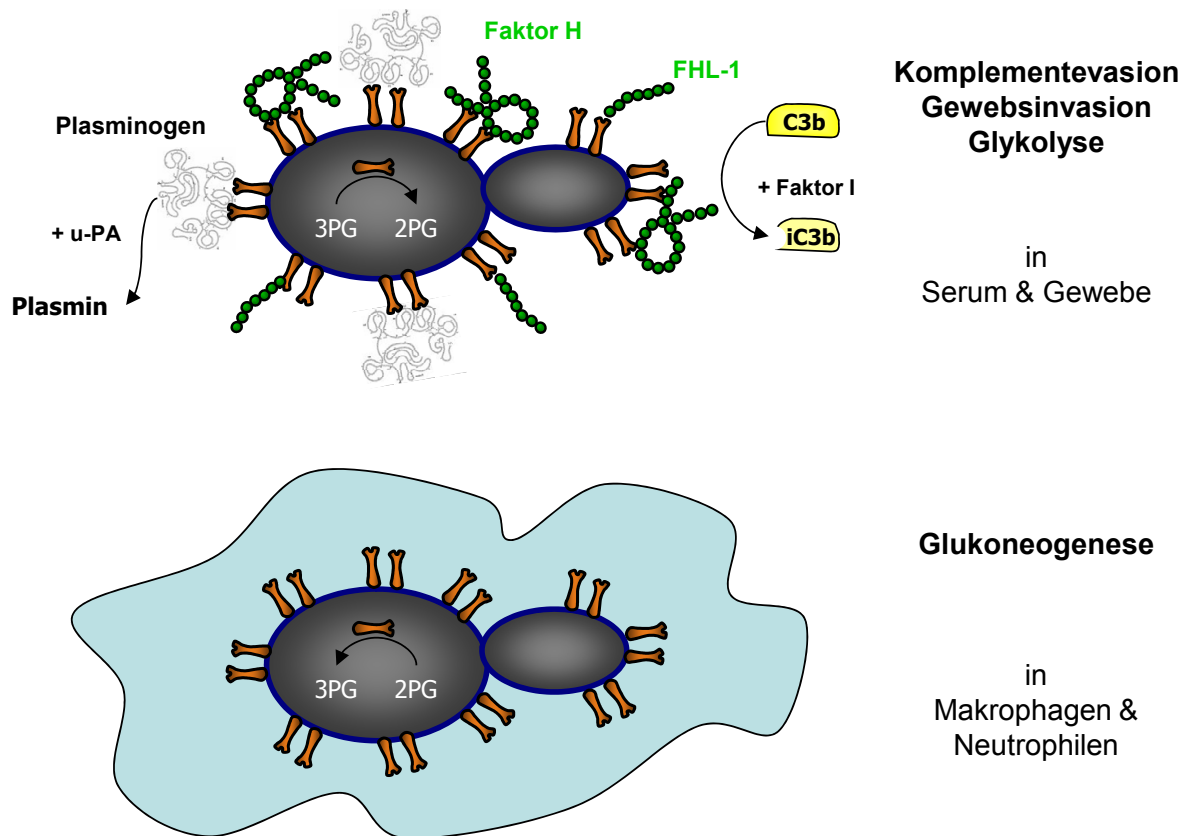


Abb. 21: CaGpm1p ist ein multifunktionelles Protein.

CaGpm1p wird auf der Oberfläche und im Zytoplasma von *C. albicans* exprimiert. In Abhängigkeit von der Lokalisation und der damit verbundenen Interaktionspartner erfüllt CaGpm1p (orange markiert) verschiedene Funktionen für *C. albicans* (grau markiert). CaGpm1p trägt so zur Komplementevasion, Gewebsinvasion, metabolischen Flexibilität und somit zur Virulenz von *C. albicans* bei.

Die in dieser Arbeit hergestellte *Cagpm1*-Nullmutante CAP3 zeigte eine reduzierte Bindung von Faktor H und Plasminogen (Abb. 18A und B), was auf eine *in vivo*-Rolle vom oberflächenexponierten CaGpm1p bei der Bindung der beiden Wirtsregulatoren hinweist. Die nur leichte Reduktion der Bindung kann durch das Vorhandensein von zusätzlichen Faktor H-, FHL-1- und Plasminogen-bindenden *C. albicans* Oberflächenproteinen erklärt werden (Meri *et al.*, 2002a, Crowe *et al.*, 2003). Demnach besitzt *C. albicans* ein redundantes System für die Bindung von Faktor H und Plasminogen.

4.2.2. Funktion des intrazellulären CaGpm1p

Intrazellulär agiert CaGpm1p als ein Schlüsselenzym in der Glykolyse und Gluconeogenese und ermöglicht das Wachstum von *C. albicans* auf fermentierbaren (Zucker) und nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen (Alkohole) (Abb. 20). Die *Cagpm1*-Nullmutante CAP3 wächst nicht auf Medium, das mit Glukose ergänzt wurde, jedoch auf Ethanol- und Glycerol-basiertem Medium (Abb. 17, Tab. 8). In gleicher Weise führt die Deletion von *ScGPM1* in *S. cerevisiae* zu einer Mutante, die nicht auf Glukose-ergänzttem Medium wachsen kann, jedoch ist auf einer Kombination von Ethanol und Glycerol Wachstum möglich (Rodicio & Heinisch, 1987). Im Unterschied zu *S. cerevisiae* ist *C. albicans* in der Lage, mit Glycerol als alleiniger Kohlenstoffquelle zu wachsen (Abb. 17, Tab. 8). Glycerol tritt in den gluconeogenischen Stoffwechsel von *C. albicans* „oberhalb“ von Gpm1p bei Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) ein (Flores *et al.*, 2000).

Die Kombination von Glycerol und Glukose im Medium führt zur Hemmung des Wachstums der *gpm1*-Nullmutante CAP3 (Tab. 8, Abb. 16). Die Gluconeogenese-Gene von *C. albicans* werden bei der physiologisch relevanten Glukose-Konzentration von ~ 0,1% im Blut von Menschen und Mäusen reprimiert (Barelle *et al.*, 2006). Dieser Effekt der Katabolitrepression ist auch für *S. cerevisiae* beschrieben (Lam & Marmur, 1977, Rodicio & Heinisch, 1987, Gancedo, 1998). Das Wachstum von CAP3 wird erst ab einer Glukose-Konzentration von unter 0,005 % wieder möglich (Abb. 16). Erst bei diesen extrem niedrigen und nicht physiologischen Glukose-Konzentrationen wird die Katabolitrepression aufgehoben.

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit scheint Glycerol auch „unterhalb“ von CaGpm1p zur Energiegewinnung genutzt zu werden (Abb. 20). Für *C. albicans* ist die flexible und zügige Anpassung an wechselnde Kohlenstoffquellen in den verschiedenen Nischen (Haut, Schleimhaut, Blut, innere Organe) überlebenswichtig (Barelle *et al.*, 2006). Die metabolische Inaktivität ist wahrscheinlich für das Pathogen *C. albicans* nicht tolerierbar, wenn neue Gene aufgrund des immunologischen Druckes exprimiert werden müssen (Ramirez & Lorenz, 2007). Der Metabolismus der saprophytischen Hefe *S. cerevisiae* steht hingegen unter einem geringeren evolutionären Druck. Darüber hinaus ist eine funktionelle Beteiligung von CaGpm2p vermutlich auszuschließen, da es eine hohe Homologie zu den funktionslosen und durch Genduplikation entstanden Proteinen Gpm2p und Gpm3p von *S. cerevisiae* aufweist (Abb. 22, (Heinisch *et al.*, 1998)).

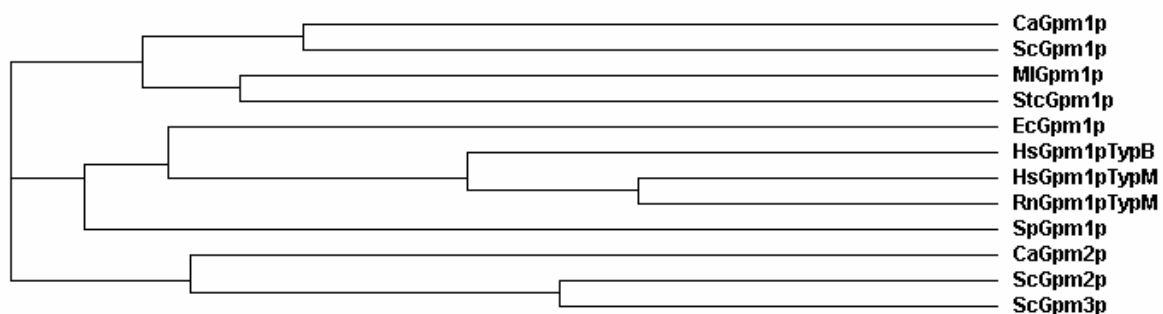


Abb. 22: Kladogramm von Gpm1p, modifiziert nach (Heinisch *et al.*, 1998).

Der Proteinsequenzvergleich der Phosphoglycerat-Mutasen von *C. albicans* (CaGpm1p), *S. cerevisiae* (ScGpm1p), *Schizosaccharomyces pombe* (SpGpm1p), *Mycobacterium leprae* (MIGpm1p), *Streptomyces coelicolor* (StcGpm1p), *E. coli* (EcGpm1p), *Homo sapiens* (HsGpm1p) und *Rattus norvegicus* (RnGpm1p) mit ClustalW2 zeigt die Homologie im Gpm1p-Kladogramm.

4.3. Gpm1p - ein Virulenzfaktor von *C. albicans*

C. albicans exprimiert verschiedene Virulenzfaktoren, die zur Pathogenese beitragen. Im embryonierten Hühnerei-Modell war die *Cagpm1*-Nullmutante CAP3 avirulent (Abb. 19). Die Avirulenz von CAP3 kann durch die Defekte im zentralen Kohlenstoffwechsel aufgrund der Deletion von *CaGPM1* erklärt werden, da die „klassischen“ Virulenzfaktoren wie der Dimorphismus, die Stress-Toleranz und die

Adhärenz an Wirtszellen weiterhin existent waren (Daten nicht gezeigt). Um eine Infektion zu etablieren, muss das Pathogen *C. albicans* Kohlenstoff assimilieren und im Wirt wachsen können (Barelle *et al.*, 2006). Alternative Kohlenstoffquellen wie z. B. Acetat, Ethanol und einige Aminosäuren sind neben Glukose und anderen Zuckern wichtige Nährstoffe *in vivo* und *C. albicans* findet und nutzt diese verschiedene Kohlenstoffquellen in den verschiedenen Nischen während der Infektion (Tab. 8, (Ramirez & Lorenz, 2007)). *C. albicans* assimiliert C6-Verbindungen durch die Glykolyse und C2- bzw. C3-Verbindungen durch den Glyoxalatzyklus und die Gluconeogenese (Flores *et al.*, 2000). Der Glyoxalatzyklus und die Gluconeogenese werden zu Beginn einer Infektion aktiviert, z. B. nach der Phagozytose durch Wirtszellen, wohingegen die nachfolgende Entwicklung einer systemischen Krankheit von der Glykolyse abhängig ist (Barelle *et al.*, 2006). Mutationen in allen drei Stoffwechselwegen schwächen die Virulenz von *C. albicans* im Maus-Modell schwerwiegend (Barelle *et al.*, 2006, Ramirez & Lorenz, 2007). Die etwas verminderte Virulenz der heterozygoten Mutante CAP1 (*gpm1/GPM1*) und der Revertante CAP5 (*gpm1/GPM1U*) im Vergleich zum Wildtyp könnte einerseits durch die veränderte Position des *URA3*-Gens ausgelöst worden sein, andererseits könnte auch ein Gendosis-Effekt vorliegen. Um den Positionseffekt des am *GPM1*-Locus integrierten *URA3*-Gens auszuschließen, müsste *URA3* in den *RPS10*-Locus integriert werden (Brand *et al.*, 2004).

Viele der heute verwendeten Medikamente gegen *C. albicans*-Infektionen besitzen starke Nebenwirkungen oder sind aufgrund von Resistenzen ineffektiv gegen fungale Infektionen. Dazu gehören z. B. das Polyen Amphotericin B, welches Ergosterole in der Pilzmembran bindet, Azole, die die Ergosterolbiosynthese hemmen sowie Echinocandine, die die Glukansynthese inhibieren (Odds *et al.*, 2003). Der alternative Kohlenstoffwechsel wird als geeignetes neues Target für Medikamente gegen *C. albicans* angesehen (Rodaki *et al.*, 2006, Ramirez & Lorenz, 2007). Die Proteinsequenz von CaGpm1p weist eine Homologie von 51 % zu der Phosphoglycerat-Mutase des Menschen auf (Abb. 22). Vielleicht gibt es eine Substanz (Antikörper), welche die Bindung von Faktor H, FHL-1 sowie Plasminogen hemmt und zwischen CaGpm1p und HsGpm1p differenzieren kann.

4.4. Ausblick

In dieser Arbeit wurde Gpm1p von *C. albicans* als ein multifunktionelles Protein identifiziert und charakterisiert. Zum einen bindet CaGpm1p die Komplementregulatoren Faktor H, FHL-1 und das fibrinolytische Plasmin. Vermutlich bindet CaGpm1p alle drei Liganden *in vivo* gleichzeitig. Daher ist zu prüfen, ob CaGpm1p verschiedene Bindestellen für die einzelnen Liganden besitzt, oder ob sich die drei Bindepartner in einem Kompetitionsassay gegenseitig verdrängen. Eine Strukturanalyse durch Kokristallisation könnte weitere Hinweise auf die Art der Interaktion geben. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob an CaGpm1p gebundenes Plasmin(ogen) auch zur Immunevasion von *C. albicans* durch eine Spaltung von C3b und IgG beitragen kann.

Zum anderen ist CaGpm1p enzymatisch in der Glykolyse und Gluconeogenese aktiv und ermöglicht so das Wachstum von *C. albicans* in verschiedenen Wirtsnischen. Daher ist es wichtig, den in dieser Arbeit vorgestellten Virulenzversuch zu wiederholen, Reisolationsversuche aus den mit *C. albicans* CAP3 infizierten Hühnerembryonen durchzuführen und den Befall von Organen und Gewebe zu überprüfen oder auch die Virulenz von CAP3 im Maus-Modell zu untersuchen. Andererseits könnte die Genaktivität von *CaGPM1* in den einzelnen Geweben des infizierten Wirts auch durch ein *C. albicans*-*GPM1*-*GFP* Konstrukt untersucht werden. Es ist noch unklar, ob das Wachstum von CAP3 im Hühnerembryo durch die Katabolitrepression inhibiert wird. Daher wäre eine Bestimmung der Glukose-Konzentration im Hühnerembryo aufschlussreich. Interessant wäre auch, das Wachstum von CAP3 in Makrophagen zu prüfen. Eine Efg1-Nullmutante könnte Aufschluss zum Mechanismus der Oberflächenexposition von CaGpm1p geben.

5. Schlussfolgerung

C. albicans bindet Plasmaproteine des Wirts an CaGpm1p und verwendet sie für eigene Zwecke. An die Oberfläche von *C. albicans* gebunden, kontrollieren die humanen Komplementregulatoren Faktor H und FHL-1 die Komplementaktivierung und hemmen die Bildung von toxischen C3-Aktivierungsprodukten. Darüber hinaus wird das an die *C. albicans*-Oberfläche gebundene Plasminogen zu proteolytisch aktivem Plasmin umgewandelt. Des Weiteren gewährleistet CaGpm1p als Phosphoglycerat-Mutase die metabolische Flexibilität von *C. albicans*. CaGpm1p repräsentiert einen multifunktionellen Virulenzfaktor von *C. albicans*, der die Immunevasion (Inhibierung der Komplementaktivierung), die Gewebsinvasion (Degradation von extrazellulären Matrixkomponenten) und die Adaptation an verschiedene Wirtsnischen (Glykolyse und Gluconeogenese) vermittelt. Mit dieser Arbeit, in der erstmalig Mechanismen der Komplementevasion und Gewebsinvasion in dem eukaryontischen Organismus *C. albicans* im Zusammenhang mit humanen Proteinen aufgeklärt werden, wird weiterhin die Hypothese untermauert, dass die Nutzung von Wirtsproteinen durch Pathogene ein zentrales Prinzip in Infektionsprozessen ist.

6. Literatur

- Alitalo, A., T. Meri, L. Ramo, T. S. Jokiranta, T. Heikkilä, I. J. Seppälä, J. Oksi, M. Viljanen & S. Meri, (2001) Complement evasion by *Borrelia burgdorferi*: serum-resistant strains promote C3b inactivation. *Infect Immun* **69**: 3685-3691.
- Barelle, C. J., C. L. Priest, D. M. MacCallum, N. A. Gow, F. C. Odds & A. J. Brown, (2006) Niche-specific regulation of central metabolic pathways in a fungal pathogen. *Cell Microbiol* **8**: 961-971.
- Barlow, P. N., D. G. Norman, A. Steinkasserer, T. J. Horne, J. Pearce, P. C. Driscoll, R. B. Sim & I. D. Campbell, (1992) Solution structure of the fifth repeat of factor H: a second example of the complement control protein module. *Biochemistry* **31**: 3626-3634.
- Behnsen, J., A. Hartmann, J. Schmalzer, A. Gehrke, A. A. Brakhage & P. F. Zipfel, (2008) The opportunistic human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* evades the host complement system. *Infect Immun* **76**: 820-827.
- Berge, A. & U. Sjöbring, (1993) PAM, a novel plasminogen-binding protein from *Streptococcus pyogenes*. *J Biol Chem* **268**: 25417-25424.
- Bergmann, S. & S. Hammerschmidt, (2007) Fibrinolysis and host response in bacterial infections. *Thromb Haemost* **98**: 512-520.
- Bergmann, S., M. Rohde, G. S. Chhatwal & S. Hammerschmidt, (2001) alpha-Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Mol Microbiol* **40**: 1273-1287.
- Bergmann, S., M. Rohde & S. Hammerschmidt, (2004) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus pneumoniae* is a surface-displayed plasminogen-binding protein. *Infect Immun* **72**: 2416-2419.
- Bergmann, S., M. Rohde, K. T. Preissner & S. Hammerschmidt, (2005) The nine residue plasminogen-binding motif of the pneumococcal enolase is the major cofactor of plasmin-mediated degradation of extracellular matrix, dissolution of fibrin and transmigration. *Thromb Haemost* **94**: 304-311.
- Berman, J., (2007) *Candida Albicans* Lithium Acetate Transformation. URL: <http://www.cbs.umn.edu/labs/berman/protocols/catrtransformation.shtml>.
- Berman, J. & P. E. Sudbery, (2002) *Candida Albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat Rev Genet* **3**: 918-930.
- Blackmore, T. K., J. Hellwage, T. A. Sadlon, N. Higgs, P. F. Zipfel, H. M. Ward & D. L. Gordon, (1998) Identification of the second heparin-binding domain in human complement factor H. *J Immunol* **160**: 3342-3348.
- Brand, A., D. M. MacCallum, A. J. Brown, N. A. Gow & F. C. Odds, (2004) Ectopic expression of *URA3* can influence the virulence phenotypes and proteome of *Candida albicans* but can be overcome by targeted reintegration of *URA3* at the *RPS10* locus. *Eukaryot Cell* **3**: 900-909.

-
- Brown, A. J., F. C. Odds & N. A. Gow, (2007) Infection-related gene expression in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* **10**: 307-313.
- Calderone, R. A. & W. A. Fonzi, (2001) Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **9**: 327-335.
- Caswell, C. C., R. Han, K. M. Hovis, P. Ciborowski, D. R. Keene, R. T. Marconi & S. Lukomski, (2008) The Scl1 protein of M6-type group A Streptococcus binds the human complement regulatory protein, factor H, and inhibits the alternative pathway of complement. *Mol Microbiol* **67**: 584-596.
- Cesarman-Maus, G. & K. A. Hajjar, (2005) Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol* **129**: 307-321.
- China, B., M. P. Sory, B. T. N'Guyen, M. De Bruyere & G. R. Cornelis, (1993) Role of the YadA protein in prevention of opsonization of *Yersinia enterocolitica* by C3b molecules. *Infect Immun* **61**: 3129-3136.
- Chung, K. M., M. K. Liszewski, G. Nybakken, A. E. Davis, R. R. Townsend, D. H. Fremont, J. P. Atkinson & M. S. Diamond, (2006) West Nile virus nonstructural protein NS1 inhibits complement activation by binding the regulatory protein factor H. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 19111-19116.
- Coleman, J. L., J. A. Gebbia, J. Piesman, J. L. Degen, T. H. Bugge & J. L. Benach, (1997) Plasminogen is required for efficient dissemination of *B. burgdorferi* in ticks and for enhancement of spirochetemia in mice. *Cell* **89**: 1111-1119.
- Crowe, J. D., I. K. Sievwright, G. C. Auld, N. R. Moore, N. A. Gow & N. A. Booth, (2003) *Candida albicans* binds human plasminogen: identification of eight plasminogen-binding proteins. *Mol Microbiol* **47**: 1637-1651.
- Dallo, S. F., T. R. Kannan, M. W. Blaylock & J. B. Baseman, (2002) Elongation factor Tu and E1 beta subunit of pyruvate dehydrogenase complex act as fibronectin binding proteins in *Mycoplasma pneumoniae*. *Mol Microbiol* **46**: 1041-1051.
- Dave, S., A. Brooks-Walter, M. K. Pangburn & L. S. McDaniel, (2001) PspC, a pneumococcal surface protein, binds human factor H. *Infect Immun* **69**: 3435-3437.
- Diaz, A., A. Ferreira & R. B. Sim, (1997) Complement evasion by *Echinococcus granulosus*: sequestration of host factor H in the hydatid cyst wall. *J Immunol* **158**: 3779-3786.
- Dimopoulos, G., A. Karabinis, G. Samonis & M. E. Falagas, (2007) Candidemia in immunocompromised and immunocompetent critically ill patients: a prospective comparative study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **26**: 377-384.
- DiScipio, R. G., (1992) Ultrastructures and interactions of complement factors H and I. *J Immunol* **149**: 2592-2599.
- Doedt, T., S. Krishnamurthy, D. P. Bockmuhl, B. Tebarth, C. Stempel, C. L. Russell, A. J. Brown & J. F. Ernst, (2004) APSES proteins regulate morphogenesis and metabolism in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **15**: 3167-3180.
- Edwards, J. E., Jr., T. A. Gaither, J. J. O'Shea, D. Rotrosen, T. J. Lawley, S. A. Wright, M. M. Frank & I. Green, (1986) Expression of specific binding sites on *Candida* with functional and antigenic characteristics of human complement receptors. *J Immunol* **137**: 3577-3583.
-

-
- Ehrlich, P. a. H. S., (1902) Über die Vielheit der Komplemente des Serums. *Berl. Klin. Wochenschr.* **39**: 297-299.
- Eigentler, A., T. F. Schulz, C. Larcher, E. M. Breitwieser, B. L. Myones, A. L. Petzer & M. P. Dierich, (1989) C3bi-binding protein on *Candida albicans*: temperature-dependent expression and relationship to human complement receptor type 3. *Infect Immun* **57**: 616-622.
- Ernst, J. F., (2000) Transcription factors in *Candida albicans* - environmental control of morphogenesis. *Microbiology* **146** (Pt 8): 1763-1774.
- Estaller, C., W. Schwaeble, M. Dierich & E. H. Weiss, (1991) Human complement factor H: two factor H proteins are derived from alternatively spliced transcripts. *Eur J Immunol* **21**: 799-802.
- Fearon, D. T. & K. F. Austen, (1975) Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase. *J Exp Med* **142**: 856-863.
- Fernandez-Arenas, E., G. Molero, C. Nombela, R. Diez-Orejas & C. Gil, (2004) Low virulent strains of *Candida albicans*: unravelling the antigens for a future vaccine. *Proteomics* **4**: 3007-3020.
- Flores, C. L., C. Rodriguez, T. Petit & C. Gancedo, (2000) Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiol Rev* **24**: 507-529.
- Fonzi, W. A. & M. Y. Irwin, (1993) Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* **134**: 717-728.
- Fox, D. & A. G. Smulian, (2001) Plasminogen-binding activity of enolase in the opportunistic pathogen *Pneumocystis carinii*. *Med Mycol* **39**: 495-507.
- Fuchs, H., R. Wallich, M. M. Simon & M. D. Kramer, (1994) The outer surface protein A of the spirochete *Borrelia burgdorferi* is a plasmin(ogen) receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 12594-12598.
- Gancedo, J. M., (1998) Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 334-361.
- Gelfand, J. A., D. L. Hurley, A. S. Fauci & M. M. Frank, (1978) Role of complement in host defense against experimental disseminated candidiasis. *J Infect Dis* **138**: 9-16.
- Gordon, D. L., R. M. Kaufman, T. K. Blackmore, J. Kwong & D. M. Lublin, (1995) Identification of complement regulatory domains in human factor H. *J Immunol* **155**: 348-356.
- Gozalbo, D., I. Gil-Navarro, I. Azorin, J. Renau-Piqueras, J. P. Martinez & M. L. Gil, (1998) The cell wall-associated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is also a fibronectin and laminin binding protein. *Infect Immun* **66**: 2052-2059.
- Gustafson, K. S., G. M. Vercellotti, C. M. Bendel & M. K. Hostetter, (1991) Molecular mimicry in *Candida albicans*. Role of an integrin analogue in adhesion of the yeast to human endothelium. *J Clin Invest* **87**: 1896-1902.
-

-
- Han, Y., T. R. Kozel, M. X. Zhang, R. S. MacGill, M. C. Carroll & J. E. Cutler, (2001) Complement is essential for protection by an IgM and an IgG3 monoclonal antibody against experimental, hematogenously disseminated candidiasis. *J Immunol* **167**: 1550-1557.
- Härtl, A., H. G. Hillesheim, W. Künkel & E. J. Schrunner, (1995) The *Candida* infected hen's egg. An alternative test system for systemic anticandida activity. *Arzneimittelforschung* **45**: 926-928.
- Haupt, K., P. Kraiczy, R. Wallich, V. Brade, C. Skerka & P. F. Zipfel, (2007) Binding of human factor H-related protein 1 to serum-resistant *Borrelia burgdorferi* is mediated by borrelial complement regulator-acquiring surface proteins. *J Infect Dis* **196**: 124-133.
- Hawlish, H. & J. Kohl, (2006) Complement and Toll-like receptors: key regulators of adaptive immune responses. *Mol Immunol* **43**: 13-21.
- Hector, R. F., J. E. Damer & E. W. Carrow, (1982) Immune responses to *Candida albicans* in genetically distinct mice. *Infect Immun* **38**: 1020-1028.
- Heidenreich, F. & M. P. Dierich, (1985) *Candida albicans* and *Candida stellatoidea*, in contrast to other *Candida* species, bind iC3b and C3d but not C3b. *Infect Immun* **50**: 598-600.
- Heinisch, J. J., S. Muller, E. Schluter, J. Jacoby & R. Rodicio, (1998) Investigation of two yeast genes encoding putative isoenzymes of phosphoglycerate mutase. *Yeast* **14**: 203-213.
- Hostetter, M. K., J. S. Lorenz, L. Preus & K. E. Kendrick, (1990) The iC3b receptor on *Candida albicans*: subcellular localization and modulation of receptor expression by glucose. *J Infect Dis* **161**: 761-768.
- Hovis, K. M., J. C. Freedman, H. Zhang, J. L. Forbes & R. T. Marconi, (2008) Identification of an antiparallel coiled-coil/loop domain required for ligand binding by the *Borrelia hermsii* FhbA protein: additional evidence for the role of FhbA in the host-pathogen interaction. *Infect Immun* **76**: 2113-2122.
- Hoyer, L. L., (2001) The ALS gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **9**: 176-180.
- Hube, B., (1996) *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases. *Curr Top Med Mycol* **7**: 55-69.
- Hube, B., D. Hess, C. A. Baker, M. Schaller, W. Schafer & J. W. Dolan, (2001) The role and relevance of phospholipase D1 during growth and dimorphism of *Candida albicans*. *Microbiology* **147**: 879-889.
- Huber-Lang, M., J. V. Sarma, F. S. Zetoune, D. Rittirsch, T. A. Neff, S. R. McGuire, J. D. Lambris, R. L. Warner, M. A. Flierl, L. M. Hoesel, F. Gebhard, J. G. Younger, S. M. Drouin, R. A. Wetzel & P. A. Ward, (2006) Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat Med* **12**: 682-687.
- Ip, W. K. & Y. L. Lau, (2004) Role of mannose-binding lectin in the innate defense against *Candida albicans*: enhancement of complement activation, but lack of opsonic function, in phagocytosis by human dendritic cells. *J Infect Dis* **190**: 632-640.
-

-
- Janulczyk, R., F. Iannelli, A. G. Sjöholm, G. Pozzi & L. Björck, (2000) Hic, a novel surface protein of *Streptococcus pneumoniae* that interferes with complement function. *J Biol Chem* **275**: 37257-37263.
- Jarva, H., T. S. Jokiranta, R. Würzner & S. Meri, (2003) Complement resistance mechanisms of streptococci. *Mol Immunol* **40**: 95-107.
- Jeffery, C. J., (2003) Moonlighting proteins: old proteins learning new tricks. *Trends Genet* **19**: 415-417.
- Johnsson, E., K. Berggård, H. Kotarsky, J. Hellwage, P. F. Zipfel, U. Sjöbring & G. Lindahl, (1998) Role of the hypervariable region in streptococcal M proteins: binding of a human complement inhibitor. *J Immunol* **161**: 4894-4901.
- Jokiranta, T. S., Z. Z. Cheng, H. Seeberger, M. Józsi, S. Heinen, M. Noris, G. Remuzzi, R. Ormsby, D. L. Gordon, S. Meri, J. Hellwage & P. F. Zipfel, (2005) Binding of complement factor H to endothelial cells is mediated by the carboxy-terminal glycosaminoglycan binding site. *Am J Pathol* **167**: 1173-1181.
- Jokiranta, T. S., J. Hellwage, V. Koistinen, P. F. Zipfel & S. Meri, (2000) Each of the three binding sites on complement factor H interacts with a distinct site on C3b. *J Biol Chem* **275**: 27657-27662.
- Jong, A. Y., S. H. Chen, M. F. Stins, K. S. Kim, T. L. Tuan & S. H. Huang, (2003) Binding of *Candida albicans* enolase to plasmin(ogen) results in enhanced invasion of human brain microvascular endothelial cells. *J Med Microbiol* **52**: 615-622.
- Kaminishi, H., H. Miyaguchi, T. Tamaki, N. Suenaga, M. Hisamatsu, I. Mihashi, H. Matsumoto, H. Maeda & Y. Hagihara, (1995) Degradation of humoral host defense by *Candida albicans* proteinase. *Infect Immun* **63**: 984-988.
- Klempner, M. S., R. Noring, M. P. Epstein, B. McCloud, R. Hu, S. A. Limentani & R. A. Rogers, (1995) Binding of human plasminogen and urokinase-type plasminogen activator to the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *J Infect Dis* **171**: 1258-1265.
- Koh, A. Y., J. R. Kohler, K. T. Coggshall, N. Van Rooijen & G. B. Pier, (2008) Mucosal damage and neutropenia are required for *Candida albicans* dissemination. *PLoS Pathog* **4**: e35.
- Kotarsky, H., J. Hellwage, E. Johnsson, C. Skerka, H. G. Svensson, G. Lindahl, U. Sjöbring & P. F. Zipfel, (1998) Identification of a domain in human factor H and factor H-like protein-1 required for the interaction with streptococcal M proteins. *J Immunol* **160**: 3349-3354.
- Kozel, T. R., (1996) Activation of the complement system by pathogenic fungi. *Clin Microbiol Rev* **9**: 34-46.
- Kozel, T. R., R. R. Brown & G. S. Pfrommer, (1987) Activation and binding of C3 by *Candida albicans*. *Infect Immun* **55**: 1890-1894.
- Kozel, T. R., L. C. Weinhold & D. M. Lupan, (1996) Distinct characteristics of initiation of the classical and alternative complement pathways by *Candida albicans*. *Infect Immun* **64**: 3360-3368.
-

-
- Kraiczy, P., C. Skerka, M. Kirschfink, V. Brade & P. F. Zipfel, (2001) Immune evasion of *Borrelia burgdorferi* by acquisition of human complement regulators FHL-1/reconectin and Factor H. *Eur J Immunol* **31**: 1674-1684.
- Kraiczy, P. & R. Würzner, (2006) Complement escape of human pathogenic bacteria by acquisition of complement regulators. *Mol Immunol* **43**: 31-44.
- Kruithof, E. K., (1988) Plasminogen activator inhibitors--a review. *Enzyme* **40**: 113-121.
- Kühn, S., C. Skerka & P. F. Zipfel, (1995) Mapping of the complement regulatory domains in the human factor H-like protein 1 and in factor H1. *J Immunol* **155**: 5663-5670.
- Kühn, S. & P. F. Zipfel, (1995) The baculovirus expression vector pBSV-8His directs secretion of histidine-tagged proteins. *Gene* **162**: 225-229.
- Kühn, S. & P. F. Zipfel, (1996) Mapping of the domains required for decay acceleration activity of the human factor H-like protein 1 and factor H. *Eur J Immunol* **26**: 2383-2387.
- Kunert, A., J. Losse, C. Gruszyn, M. Huhn, K. Kaendler, S. Mikkat, D. Volke, R. Hoffmann, T. S. Jokiranta, H. Seeberger, U. Moellmann, J. Hellwage & P. F. Zipfel, (2007) Immune Evasion of the Human Pathogen *Pseudomonas aeruginosa*: Elongation Factor Tuf Is a Factor H and Plasminogen Binding Protein. *J Immunol* **179**: 2979-2988.
- Lähteenmäki, K., P. Kuusela & T. K. Korhonen, (2001) Bacterial plasminogen activators and receptors. *FEMS Microbiol Rev* **25**: 531-552.
- Lam, K. B. & J. Marmur, (1977) Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* glycolytic pathway mutants. *J Bacteriol* **130**: 746-749.
- Lambris, J. D., D. Ricklin & B. V. Geisbrecht, (2008) Complement evasion by human pathogens. *Nat Rev Microbiol* **6**: 132-142.
- Law, S. K. & R. P. Levine, (1977) Interaction between the third complement protein and cell surface macromolecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 2701-2705.
- Lijnen, H. R. & D. Collen, (1995) Mechanisms of physiological fibrinolysis. *Baillieres Clin Haematol* **8**: 277-290.
- Madico, G., J. Ngampasutadol, S. Gulati, U. Vogel, P. A. Rice & S. Ram, (2007) Factor H binding and function in sialylated pathogenic neisseriae is influenced by gonococcal, but not meningococcal, porin. *J Immunol* **178**: 4489-4497.
- Mangel, W. F., B. H. Lin & V. Ramakrishnan, (1990) Characterization of an extremely large, ligand-induced conformational change in plasminogen. *Science* **248**: 69-73.
- Markiewski, M. M., B. Nilsson, K. N. Ekdahl, T. E. Mollnes & J. D. Lambris, (2007) Complement and coagulation: strangers or partners in crime? *Trends Immunol* **28**: 184-192.
- Medicus, R. G., O. Gotze & H. J. Muller-Eberhard, (1976) Alternative pathway of complement: recruitment of precursor properdin by the labile C3/C5 convertase and the potentiation of the pathway. *J Exp Med* **144**: 1076-1093.
-

-
- Meri, T., A. M. Blom, A. Hartmann, D. Lenk, S. Meri & P. F. Zipfel, (2004) The hyphal and yeast forms of *Candida albicans* bind the complement regulator C4b-binding protein. *Infect Immun* **72**: 6633-6641.
- Meri, T., A. Hartmann, D. Lenk, R. Eck, R. Wurzner, J. Hellwage, S. Meri & P. F. Zipfel, (2002a) The yeast *Candida albicans* binds complement regulators factor H and FHL-1. *Infect Immun* **70**: 5185-5192.
- Meri, T., T. S. Jokiranta, J. Hellwage, A. Bialonski, P. F. Zipfel & S. Meri, (2002b) *Onchocerca volvulus* microfilariae avoid complement attack by direct binding of factor H. *J Infect Dis* **185**: 1786-1793.
- Mignatti, P. & D. B. Rifkin, (1993) Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev* **73**: 161-195.
- Misasi, R., H. P. Huemer, W. Schwaeble, E. Solder, C. Larcher & M. P. Dierich, (1989) Human complement factor H: an additional gene product of 43 kDa isolated from human plasma shows cofactor activity for the cleavage of the third component of complement. *Eur J Immunol* **19**: 1765-1768.
- Molkanen, T., J. Tynnela, J. Helin, N. Kalkkinen & P. Kuusela, (2002) Enhanced activation of bound plasminogen on *Staphylococcus aureus* by staphylokinase. *FEBS Lett* **517**: 72-78.
- Moors, M. A., T. L. Stull, K. J. Blank, H. R. Buckley & D. M. Mosser, (1992) A role for complement receptor-like molecules in iron acquisition by *Candida albicans*. *J Exp Med* **175**: 1643-1651.
- Morelli, R. & L. T. Rosenberg, (1971) Role of Complement During Experimental *Candida* Infection in Mice. *Infect Immun* **3**: 521-523.
- Morrison, R. P. & J. E. Cutler, (1981) In vitro studies of the interaction of murine phagocytic cells with *Candida albicans*. *J Reticuloendothel Soc* **29**: 23-34.
- Motshwene, P., W. Brandt & G. Lindsey, (2003) Significant quantities of the glycolytic enzyme phosphoglycerate mutase are present in the cell wall of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* **369**: 357-362.
- Murthy, K. H., S. A. Smith, V. K. Ganesh, K. W. Judge, N. Mullin, P. N. Barlow, C. M. Ogata & G. J. Kotwal, (2001) Crystal structure of a complement control protein that regulates both pathways of complement activation and binds heparan sulfate proteoglycans. *Cell* **104**: 301-311.
- Naglik, J. R., S. J. Challacombe & B. Hube, (2003) *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 400-428, table of contents.
- Neeleman, C., S. P. Geelen, P. C. Aerts, M. R. Daha, T. E. Mollnes, J. J. Roord, G. Posthuma, H. van Dijk & A. Fleer, (1999) Resistance to both complement activation and phagocytosis in type 3 pneumococci is mediated by the binding of complement regulatory protein factor H. *Infect Immun* **67**: 4517-4524.
- Nilsson, U. R. & H. J. Mueller-Eberhard, (1965) Isolation of Beta If-Globulin from Human Serum and Its Characterization as the Fifth Component of Complement. *J Exp Med* **122**: 277-298.
-

-
- Nombela, C., C. Gil & W. L. Chaffin, (2006) Non-conventional protein secretion in yeast. *Trends Microbiol* **14**: 15-21.
- Odds, F. C., A. J. Brown & N. A. Gow, (2003) Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol* **11**: 272-279.
- Ollert, M. W., E. Wadsworth & R. A. Calderone, (1990) Reduced expression of the functionally active complement receptor for iC3b but not for C3d on an avirulent mutant of *Candida albicans*. *Infect Immun* **58**: 909-913.
- Oppermann, M., T. Manuelian, M. Jozsi, E. Brandt, T. S. Jokiranta, S. Heinen, S. Meri, C. Skerka, O. Gotze & P. F. Zipfel, (2006) The C-terminus of complement regulator Factor H mediates target recognition: evidence for a compact conformation of the native protein. *Clin Exp Immunol* **144**: 342-352.
- Pancholi, V. & G. S. Chhatwal, (2003) Housekeeping enzymes as virulence factors for pathogens. *Int J Med Microbiol* **293**: 391-401.
- Pancholi, V. & V. A. Fischetti, (1992) A major surface protein on group A streptococci is a glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase with multiple binding activity. *J Exp Med* **176**: 415-426.
- Pancholi, V. & V. A. Fischetti, (1998) alpha-enolase, a novel strong plasmin(ogen) binding protein on the surface of pathogenic streptococci. *J Biol Chem* **273**: 14503-14515.
- Pandiripally, V., L. Wei, C. Skerka, P. F. Zipfel & D. Cue, (2003) Recruitment of complement factor H-like protein 1 promotes intracellular invasion by group A streptococci. *Infect Immun* **71**: 7119-7128.
- Pangburn, M. K., M. A. Atkinson & S. Meri, (1991) Localization of the heparin-binding site on complement factor H. *J Biol Chem* **266**: 16847-16853.
- Pangburn, M. K., R. D. Schreiber & H. J. Muller-Eberhard, (1977) Human complement C3b inactivator: isolation, characterization, and demonstration of an absolute requirement for the serum protein beta1H for cleavage of C3b and C4b in solution. *J Exp Med* **146**: 257-270.
- Pangburn, M. K., R. D. Schreiber & H. J. Muller-Eberhard, (1981) Formation of the initial C3 convertase of the alternative complement pathway. Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester in native C3. *J Exp Med* **154**: 856-867.
- Pardo, M., M. Ward, S. Bains, M. Molina, W. Blackstock, C. Gil & C. Nombela, (2000a) A proteomic approach for the study of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall biogenesis. *Electrophoresis* **21**: 3396-3410.
- Pardo, M., M. Ward, A. Pitarch, M. Sanchez, C. Nombela, W. Blackstock & C. Gil, (2000b) Cross-species identification of novel *Candida albicans* immunogenic proteins by combination of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry. *Electrophoresis* **21**: 2651-2659.
- Pfaller, M. A. & D. J. Diekema, (2007) Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* **20**: 133-163.
-

-
- Phan, Q. T., C. L. Myers, Y. Fu, D. C. Sheppard, M. R. Yeaman, W. H. Welch, A. S. Ibrahim, J. E. Edwards, Jr. & S. G. Filler, (2007) Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. *PLoS Biol* **5**: e64.
- Pitarch, A., M. Sanchez, C. Nombela & C. Gil, (2002) Sequential fractionation and two-dimensional gel analysis unravels the complexity of the dimorphic fungus *Candida albicans* cell wall proteome. *Mol Cell Proteomics* **1**: 967-982.
- Plow, E. F., T. Herren, A. Redlitz, L. A. Miles & J. L. Hoover-Plow, (1995) The cell biology of the plasminogen system. *Faseb J* **9**: 939-945.
- Ram, S., F. G. Mackinnon, S. Gulati, D. P. McQuillen, U. Vogel, M. Frosch, C. Elkins, H. K. Guttormsen, L. M. Wetzler, M. Oppermann, M. K. Pangburn & P. A. Rice, (1999) The contrasting mechanisms of serum resistance of *Neisseria gonorrhoeae* and group B *Neisseria meningitidis*. *Mol Immunol* **36**: 915-928.
- Ram, S., D. P. McQuillen, S. Gulati, C. Elkins, M. K. Pangburn & P. A. Rice, (1998a) Binding of complement factor H to loop 5 of porin protein 1A: a molecular mechanism of serum resistance of nonsialylated *Neisseria gonorrhoeae*. *J Exp Med* **188**: 671-680.
- Ram, S., A. K. Sharma, S. D. Simpson, S. Gulati, D. P. McQuillen, M. K. Pangburn & P. A. Rice, (1998b) A novel sialic acid binding site on factor H mediates serum resistance of sialylated *Neisseria gonorrhoeae*. *J Exp Med* **187**: 743-752.
- Ramirez, M. A. & M. C. Lorenz, (2007) Mutations in alternative carbon utilization pathways in *Candida albicans* attenuate virulence and confer pleiotropic phenotypes. *Eukaryot Cell* **6**: 280-290.
- Ray, T. L. & K. D. Wuepper, (1976) Activation of the alternative (properdin) pathway of complement by *Candida albicans* and related species. *J Invest Dermatol* **67**: 700-703.
- Ray, T. L. & K. D. Wuepper, (1978) Experimental cutaneous candidiasis in rodents; II. Role of the stratum corneum barrier and serum complement as a mediator of a protective inflammatory response. *Arch Dermatol* **114**: 539-543.
- Rodaki, A., T. Young & A. J. Brown, (2006) Effects of depleting the essential central metabolic enzyme fructose-1,6-bisphosphate aldolase on the growth and viability of *Candida albicans*: implications for antifungal drug target discovery. *Eukaryot Cell* **5**: 1371-1377.
- Rodicio, R. & J. Heinisch, (1987) Isolation of the yeast phosphoglyceromutase gene and construction of deletion mutants. *Mol Gen Genet* **206**: 133-140.
- Rodriguez de Cordoba, S., M. A. Diaz-Guillen & D. Heine-Suner, (1999) An integrated map of the human regulator of complement activation (RCA) gene cluster on 1q32. *Mol Immunol* **36**: 803-808.
- Rodriguez de Cordoba, S., J. Esparza-Gordillo, E. Goicoechea de Jorge, M. Lopez-Trascasa & P. Sanchez-Corral, (2004) The human complement factor H: functional roles, genetic variations and disease associations. *Mol Immunol* **41**: 355-367.
- Romani, L., (2004) Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol* **4**: 1-23.
- Rooijackers, S. H. & J. A. van Strijp, (2007) Bacterial complement evasion. *Mol Immunol* **44**: 23-32.
-

-
- Rooijackers, S. H., W. J. van Wamel, M. Ruyken, K. P. van Kessel & J. A. van Strijp, (2005) Anti-opsonic properties of staphylokinase. *Microbes Infect* **7**: 476-484.
- Rooney, P. J. & B. S. Klein, (2002) Linking fungal morphogenesis with virulence. *Cell Microbiol* **4**: 127-137.
- Rossmann, E., P. Kraiczy, P. Herzberger, C. Skerka, M. Kirschfink, M. M. Simon, P. F. Zipfel & R. Wallich, (2007) Dual binding specificity of a *Borrelia hermsii*-associated complement regulator-acquiring surface protein for factor H and plasminogen discloses a putative virulence factor of relapsing fever spirochetes. *J Immunol* **178**: 7292-7301.
- Ruchel, R., (1986) Cleavage of immunoglobulins by pathogenic yeasts of the genus *Candida*. *Microbiol Sci* **3**: 316-319.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press New York.
- Sanger, F., S. Nicklen & A. R. Coulson, (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467.
- Schaller, M., C. Borelli, H. C. Korting & B. Hube, (2005) Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses* **48**: 365-377.
- Schlaf, G., T. Demberg, N. Beisel, H. L. Schieferdecker & O. Gotze, (2001) Expression and regulation of complement factors H and I in rat and human cells: some critical notes. *Mol Immunol* **38**: 231-239.
- Setiadi, E. R., T. Doedt, F. Cottier, C. Noffz & J. F. Ernst, (2006) Transcriptional response of *Candida albicans* to hypoxia: linkage of oxygen sensing and Efg1p-regulatory networks. *J Mol Biol* **361**: 399-411.
- Sfyroera, G., M. Katragadda, D. Morikis, S. N. Isaacs & J. D. Lambris, (2005) Electrostatic modeling predicts the activities of orthopoxvirus complement control proteins. *J Immunol* **174**: 2143-2151.
- Sim, R. B., T. M. Twose, D. S. Paterson & E. Sim, (1981) The covalent-binding reaction of complement component C3. *Biochem J* **193**: 115-127.
- Sjöström, I., H. Gröndahl, G. Falk, G. Kronvall & M. Ullberg, (1997) Purification and characterisation of a plasminogen-binding protein from *Haemophilus influenzae*. Sequence determination reveals identity with aspartase. *Biochim Biophys Acta* **1324**: 182-190.
- Sohnle, P. G., M. M. Frank & C. H. Kirkpatrick, (1976) Deposition of complement components in the cutaneous lesions of chronic mucocutaneous candidiasis. *Clin Immunol Immunopathol* **5**: 340-350.
- Soll, D. R., (1992) High-frequency switching in *Candida albicans*. *Clin Microbiol Rev* **5**: 183-203.
- Spellberg, B., (2008) Novel insights into disseminated candidiasis: pathogenesis research and clinical experience converge. *PLoS Pathog* **4**: e38.
- Stoiber, H., A. Clivio & M. P. Dierich, (1997) Role of complement in HIV infection. *Annu Rev Immunol* **15**: 649-674.
-

-
- Sun, H., (2006) The interaction between pathogens and the host coagulation system. *Physiology (Bethesda)* **21**: 281-288.
- Sundstrom, P., (2002) Adhesion in *Candida* spp. *Cell Microbiol* **4**: 461-469.
- Thong, Y. H. & A. Ferrante, (1978) Alternative pathway of complement activation by *Candida albicans*. *Aust N Z J Med* **8**: 620-622.
- Tortorano, A. M., C. Kibbler, J. Peman, H. Bernhardt, L. Klingspor & R. Grillot, (2006) Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. *International journal of antimicrobial agents* **27**: 359-366.
- Urban, C., X. Xiong, K. Sohn, K. Schroppel, H. Brunner & S. Rupp, (2005) The moonlighting protein Tsa1p is implicated in oxidative stress response and in cell wall biogenesis in *Candida albicans*. *Mol Microbiol* **57**: 1318-1341.
- Vassalli, J. D., A. Wohlwend & D. Belin, (1992) Urokinase-catalyzed plasminogen activation at the monocyte/macrophage cell surface: a localized and regulated proteolytic system. *Curr Top Microbiol Immunol* **181**: 65-86.
- Vogl, G., I. Lesiak, D. B. Jensen, S. Perkhofer, R. Eck, C. Speth, C. Lass-Flörl, P. F. Zipfel, A. M. Blom, M. P. Dierich & R. Würzner, (2008) Immune evasion by acquisition of complement inhibitors: the mould *Aspergillus* binds both factor H and C4b binding protein. *Mol Immunol* **45**: 1485-1493.
- von Dungern, E., (1900) Beiträge zur Immunitätslehre. *Münch. Med. Wochenschr.* **47**: 677-680.
- Walport, M. J., (2001) Complement. First of two parts. *N Engl J Med* **344**: 1058-1066.
- Weiler, J. M., M. R. Daha, K. F. Austen & D. T. Fearon, (1976) Control of the amplification convertase of complement by the plasma protein beta1H. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**: 3268-3272.
- Wessels, J. G. H., (1993) Wall Growth, Protein Excretion and Morphogenesis in Fungi. *New Phytologist* **123**: 397-413.
- Whaley, K. & S. Ruddy, (1976) Modulation of the alternative complement pathways by beta 1 H globulin. *J Exp Med* **144**: 1147-1163.
- Winram, S. B. & R. Lottenberg, (1996) The plasmin-binding protein Plr of group A streptococci is identified as glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Microbiology* **142** (Pt 8): 2311-2320.
- Wisplinghoff, H., T. Bischoff, S. M. Tallent, H. Seifert, R. P. Wenzel & M. B. Edmond, (2004) Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* **39**: 309-317.
- Zhang, M. X. & T. R. Kozel, (1998) Mannan-specific immunoglobulin G antibodies in normal human serum accelerate binding of C3 to *Candida albicans* via the alternative complement pathway. *Infect Immun* **66**: 4845-4850.
- Zhang, X., Y. Kimura, C. Fang, L. Zhou, G. Sfyroera, J. D. Lambris, R. A. Wetsel, T. Miwa & W. C. Song, (2007) Regulation of Toll-like receptor-mediated inflammatory response by complement *in vivo*. *Blood* **110**: 228-236.
-

- Zipfel, P. F., S. Heinen, M. Jozsi & C. Skerka, (2006) Complement and diseases: defective alternative pathway control results in kidney and eye diseases. *Mol Immunol* **43**: 97-106.
- Zipfel, P. F., T. S. Jokiranta, J. Hellwage, V. Koistinen & S. Meri, (1999) The factor H protein family. *Immunopharmacology* **42**: 53-60.
- Zipfel, P. F., Kraiczy, P., Hellwage, J., (2002) Das tägliche Versteckspiel (Wie Mikroorganismen der Immunabwehr entgehen). *Biologie in unserer Zeit* **6**: 371-379.
- Zipfel, P. F., C. Skerka, J. Hellwage, S. T. Jokiranta, S. Meri, V. Brade, P. Kraiczy, M. Noris & G. Remuzzi, (2002) Factor H family proteins: on complement, microbes and human diseases. *Biochem Soc Trans* **30**: 971-978.
- Zipfel, P. F., R. Wurzner & C. Skerka, (2007) Complement evasion of pathogens: common strategies are shared by diverse organisms. *Mol Immunol* **44**: 3850-3857.

Eigene wissenschaftliche Beiträge

Publikationen

Poltermann S., Kunert A., von der Heide M., Eck R., Hartmann A., Zipfel P.F., 2007.
Gpm1p is a factor H-, FHL-1-, and plasminogen-binding surface protein of *Candida albicans*.
J Biol Chem. 282(52):37537-44. Epub 2007 Oct 24.

Luo S., **Poltermann S.**, Hipler U.C., Zipfel P.F., in Vorbereitung.
Immune Evasion of the Human Pathogen *Candida albicans*: pH-regulated Antigen 1
Is a Factor H, FHL-1 and Plasminogen Binding Protein.

Vorträge

Poltermann S., Kunert A., Zipfel P.F., 2005.
Identification of *Candida albicans* molecules involved in binding of the complement regulators Factor H and FHL-1.
Oral presentation at Wittenberger Arbeitstreffen "Infectivity and host cells", Wittenberg, October 2005.

Poltermann S., Kunert A., Hartmann A., Zipfel P.F., 2006.
Funktionelle Charakterisierung von CRASP-1 aus *Candida albicans*: Bindung von Komplementregulatoren und Plasminogen.
Oral presentation at Statusworkshop of the DGHM-Fachgruppe "Eukaryontische Krankheitserreger", München, February 2006.

Vortrag mit 100 € Reisekostenstipendium ausgezeichnet.

Poltermann S., Hartmann A., Zipfel P.F., Kunert A., 2006.
Immune escape of *Candida albicans*: Identification and Characterization of CaCRASP-1.
Oral presentation at Jahrestagung VAAM, Jena, March 2006.

Poltermann S., Kunert A., Zipfel P.F., 2006.
Complement Escape of *Candida albicans*: Identification and Characterization of the Yeast Surface Protein CaCRASP-1.
Oral presentation at the XXI International Complement Workshop, Beijing/China, October 2006.

Vortrag mit 1000 € „Trainee Award“ ausgezeichnet

Poltermann S., 2007.
Komplementevasion der humanpathogenen Hefe *Candida albicans*.
Oral presentation at the HKI Symposium, Jena, February 2007.

Poltermann S., Kunert A., Zipfel P.F., 2007.

CaCRASP-1: a surface protein of *Candida albicans* binding complement regulators and a fibrinolytic enzyme.

Oral presentation at Statusworkshop of the DGHM-Fachgruppe "Eukaryontische Krankheitserreger", Stuttgart, February 2007.

Vortrag mit 100 € Reisekostenstipendium ausgezeichnet

Poltermann S., von der Heide M., Kunert A., Zipfel P.F., 2007.

CaCRASP-1/Gpm1: a multifunctional protein of *Candida albicans* acting in complement escape, tissue invasion and glycolysis/gluconeogenesis.

Oral presentation at Jahrestagung DGHM, Göttingen, October 2007.

Posterpräsentationen

Poltermann S., Hartmann A., Nguyen M., Eck R., Zipfel P. F., Kunert A., 2005.

Identification of *Candida albicans* molecules involved in binding of the complement regulators Factor H and FHL-1.

Poster presented at the 10th European Meeting on Complement in Human Disease, Heidelberg, September 2005.

Poltermann S., Hartmann A., Nguyen M., Eck R., Kunert A., Zipfel P.F., 2005.

Complement evasion of *Candida albicans*: identification of molecules binding the complement regulators Factor H and FHL-1.

Poster presented at Jahrestagung VAAM & DGHM, Göttingen, October 2005.

Poltermann S., Kunert A., Luo S., Schindler S., Zipfel P.F., 2007.

Komplementevasion von humanpathogenen Pilzen.

Poster presented at 1st ILRS Symposium, Dornburg, September 2007.

Danksagung

Diese Dissertation wurde am Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e. V. / Hans-Knöll-Institut Jena in der Abteilung Infektionsbiologie angefertigt.

Ein großes Dankeschön gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Peter F. Zipfel für die Aufgabenstellung sowie für die fachliche und nachhaltige Unterstützung bei der Bearbeitung dieses interessanten Themas. Auf wissenschaftlichen Konferenzen hat mir Prof. Dr. Bernhard Hube in fachlichen Diskussionen wertvolle Ratschläge zu meiner Arbeit gegeben, wofür ich mich herzlich bedanken möchte. Meinem externen Gutachter aus dem „DFG SPP 1160: Kolonisation und Infektion humanpathogener Pilze“ danke ich ebenfalls für die Übernahme des Gutachtens dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Anja Kunert für die wissenschaftliche Betreuung und Motivation in den ersten zwei Jahren meiner Doktorarbeit und darüber hinaus.

Herrn Dr. Gerhard Wieland und Andrea Hartmann danke ich für die LSM-Untersuchungen. Bei Dr. Katrin Haupt möchte ich mich für die Durchführung des Fibrinogen-Assays bedanken. Weiterhin möchte ich Monika von der Heide recht herzlich für die Unterstützung bei der Herstellung und Charakterisierung der *C. albicans*-Mutantenstämme danken. Ein weiterer Dank geht an sie und Ina Löschmann für die Sequenzierungen. Bei Gerlinde Heckrodt möchte ich mich für die Bereitstellung der Faktor H-Fragmente bedanken. Ebenfalls danke ich Dr. Ilse Jacobsen sowie ihren Mitarbeiterinnen für die Durchführung und Betreuung der Virulenztests. Außerdem möchte ich mich bei allen nicht namentlich aufgeführten Mitarbeitern der Abteilung Infektionsbiologie für die freundliche Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft bedanken.

Ich danke den Mädels aus dem „ornithologischen“ Labor 019, der kompletten Mittagsrunde und meiner Freundin Dr. Katharina Mihatsch für ihre wissenschaftlichen Anregungen und die moralische Unterstützung. Steffi Hälbig und Stefanie Strobel möchte ich ganz herzlich für ihren Beistand in der Endphase meiner Arbeit danken.

Meinem Freund und meinen Eltern danke ich aufrichtig für ihre liebevolle und ausnahmslose Unterstützung während der Promotion und der Anfertigung dieser Arbeit.

Thesen

zur Dissertation von Dipl.-Biologin Sophia Poltermann

Der Mensch verfügt über ein hocheffizientes Immunsystem, das in der Lage ist, mikrobielle Keime zu erkennen und zu eliminieren sowie die körpereigene Integrität zu schützen. Dieses Abwehrsystem agiert auf mehreren Ebenen und besitzt zahlreiche Mechanismen. Pathogene Erreger haben gelernt, die humanen Schutzsysteme zu inaktivieren und zum eigenen Vorteil zu nutzen, um so ihr Überleben im Wirt zu sichern.

1. Das Komplementsystem ist ein wesentlicher Bestandteil der angeborenen Immunität und wehrt Mikroben ab. Die bedeutendste humanpathogene Hefe *Candida albicans* wird vom Komplementsystem erkannt, entgeht aber der Komplementattacke durch die Bindung der wichtigsten humanen Komplementregulatoren des alternativen Weges Faktor H und FHL-1. Darüber hinaus benutzt *C. albicans* das humane fibrinolytische System zur Gewebsinvasion.
2. Die Aufklärung der Interaktionen zwischen *C. albicans* und dem Menschen auf molekularer Ebene liefert einen entscheidenden Beitrag zur erfolgreichen Behandlung von *C. albicans*-Infektionen und der Entwicklung neuer Therapien.
3. Gpm1p von *C. albicans* (CaGpm1p) ist ein Faktor H- und FHL-1-bindendes Protein. Das aufgereinigte rekombinante CaGpm1p bindet *in vitro* spezifisch Faktor H und FHL-1, aber nicht C4BP.
4. Die Binderegionen für CaGpm1p sind innerhalb der beiden Wirtsproteine identifiziert. FHL-1 bindet an CaGpm1p durch die SCRs 6 und 7, und Faktor H verwendet zwei Binderegionen, die in den SCRs 6 und 7 sowie in den SCRs 19 und 20 lokalisiert sind.
5. Rekombinantes CaGpm1p bindet *in vitro* mittels Lysin-Resten humanes Plasminogen.

6. Jedes der drei humanen Plasmaproteine, Faktor H, FHL-1 und Plasminogen, ist in CaGpm1p-gebundener Form funktionell aktiv. Faktor H und FHL-1 zeigen Kofaktoraktivität für die Faktor I-vermittelte Spaltung von C3b und gebundenes Plasminogen wird durch den Urokinase-Plasminogenaktivator zu fibrinolytisch aktivem Plasmin umgewandelt.
7. CaGpm1p ist ein Protein, das in der Zellwand und im Zytoplasma von *C. albicans* durch Western-Blot und auf der Zelloberfläche von intakten *C. albicans*-Hefezellen und -Hyphen durch Immunfärbung mit einem spezifischen Antiserum nachgewiesen werden kann.
8. Das Oberflächenprotein CaGpm1p der Hefe akquiriert im Plasma die humanen Komplementregulatoren Faktor H und FHL-1 sowie den Wirtsproteasen-Vorläufer Plasminogen an die *C. albicans*-Oberfläche. Dieser Mechanismus ermöglicht dem Pathogen die Immunevasion und Gewebsinvasion.
9. *C. albicans* besitzt ein redundantes System zur Bindung der humanen Regulatoren. Die Bindung von Faktor H und Plasminogen an die in dieser Arbeit generierte *Cagpm1*-Nullmutante CAP3 ist nur geringfügig reduziert.
10. CaGpm1p besitzt intrazellulär enzymatische Funktionen in der Glykolyse und Gluconeogenese. Die in dieser Arbeit generierte *Cagpm1*-Nullmutante CAP3 zeigt einen Wachstumsdefekt auf glykolytischen und gluconeogenischen Substraten.
11. CaGpm1p ermöglicht die flexible metabolische Anpassung von *C. albicans* an verschiedene Wirtsnischen und trägt zur Virulenz bei. Die *Cagpm1*-Nullmutante CAP3 ist avirulent im embryonierten Hühnerei-Modell.
12. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, wie *C. albicans* auf molekularer Ebene mit dem Menschen interagiert und dass das multifunktionelle CaGpm1p verschiedene Phasen der Pathogenese von *C. albicans* reguliert.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena vom 16. Juli 2007 bekannt ist.

Ich versichere, die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst und nur die angegebenen Quellen, persönlichen Mitteilungen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde von mir nicht in Anspruch genommen.

Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit der vorgelegten Dissertation stehen.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Prüfungsbehörde oder Hochschule eingereicht.

München, den 1. Juli 2008

Sophia Poltermann